

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 220**

51 Int. Cl.:

|                    |           |                   |           |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| <b>C07K 16/24</b>  | (2006.01) | <b>C12N 5/22</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/395</b> | (2006.01) | <b>C12N 15/13</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 3/10</b>   | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 9/10</b>   | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 29/00</b>  | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 35/00</b>  | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 37/00</b>  | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 37/06</b>  | (2006.01) |                   |           |
| <b>A61P 43/00</b>  | (2006.01) |                   |           |
| <b>C12P 21/08</b>  | (2006.01) |                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 07792618 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2046834**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales frente al factor 1 derivado del estroma (SDF-1)**

30 Prioridad:

**11.08.2006 US 837004 P**

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

**20.02.2013**

73 Titular/es:

**ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)  
1-5, DOSHOMACHI 2-CHOME  
CHUO-KU OSAKA 541-0045, JP y  
MEDAREX, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POGUE, SARAH L.;  
KORMAN, ALAN J.;  
CARDARELLI, JOSEPHINE M.;  
SRINIVASAN, MOHAN;  
CHEN, BINGLIANG y  
BELL, ALASDAIR F.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 396 220 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

Anticuerpos monoclonales frente al factor 1 derivado del estroma (SDF-1)

## Antecedentes de la invención

5 Las quimiocinas son proteínas secretadas que participan en la migración de subconjuntos de leucocitos a sitios de inflamación, linfopoyesis, angiogénesis y desarrollo de órganos linfoides (Nelson y Krensky (2001) *Immunity* 14:377-86; Campbell *et al.* (2003) *Immunol Rev* 195:58-71; Moser *et al.* (2004) *Trends Immunol* 25:75-84; Moriguchi *et al.* (2005) *J Biol Chem* 280:17408-14). Las quimiocinas, a través de su acción en la inducción de respuestas quimiotácticas celulares, desempeñan un papel en diversas enfermedades inflamatorias e infecciosas. Las dos subfamilias principales se distinguen por la posición de las dos primeras cisteínas, bien separadas por un aminoácido (quimiocinas CXC) o bien adyacentes (quimiocinas CC) (Zlotnik y Yoshie (2000) *Immunity* 12:121-7; Loetscher y Clark-Lewis (2001) *J Leukocyte Biol* 69:881-4). Las quimiocinas median su función uniéndose a receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Murphy *et al.* (2000) *Pharmacol Rev* 52:145-76).

15 La quimiocina factor 1 derivado del estroma (SDF-1/CXCL12) es el único ligando natural conocido del receptor CXCR4. Informes recientes indican que el SDF-1 puede funcionar como ligando para un segundo receptor, RDC1 (CXCR7) (Balabanian *et al.* (2005) *J Biol Chem* 280:35760-35766). El CXCR4 se expresa ampliamente en células tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas y se ha descubierto su expresión en determinadas células tumorales. Se ha sugerido que el SDF-1 desempeña un papel en la dirección de la metástasis de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> a órganos tales como el ganglio linfático, el pulmón, el hígado y el hueso, que expresan altamente SDF-1 (Kucia *et al.* (2005) *Stem Cells* 23:879-894). Estudios adicionales han mostrado que células estromales derivadas de la médula o mesenquimales dentro del microentorno del tumor secretan SDF-1 de forma constitutiva (Burger y Kipps 2005).

25 Modelos murinos con inactivación de SDF-1 muestran que el SDF-1 es crucial para la colonización de la médula ósea por las células madre hematopoyéticas derivadas de hígado fetal durante la embriogénesis, la retención de estas células en la vida adulta, la formación de vasos sanguíneos en el tubo gastrointestinal, la formación del tabique ventricular cardíaco y la diferenciación del cerebelo (Nagasawa *et al.* (1996) *Nature* 382:635-8; Ma *et al.* (1999) *Immunity* 10:463-71; You *et al.* (1998) *Nature* 393:595-9). También se ha sugerido que el SDF-1 participa en la activación de cinasas tanto Jak como Stat (Vila-Coro *et al.* (1999) *FASEB* 713:1699-1710; Zhang *et al.* (2001) *Blood* 97:3342-8). Asimismo, en diabéticos con retinopatía diabética proliferativa, se mostró que los niveles de SDF-1 estaban aumentados localmente en el ojo (Butler *et al.* (2005) *J Clin Invest* 115:86-931).

## Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a SDF-1 y que presentan numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen unión de alta afinidad a SDF-1 humano. En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo:

- (a) se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos; y
- (b) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación.

Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, aunque en realizaciones alternativas, el anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

40 En una realización, el anticuerpo se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $4 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o menos o se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M o menos.

45 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en la que el anticuerpo compite de forma cruzada por unirse a SDF-1 con un anticuerpo de referencia que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4; y
- 50 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8.

En diversas realizaciones, el anticuerpo de referencia comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y

- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o el anticuerpo de referencia comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
- 5 o el anticuerpo de referencia comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; o el anticuerpo de referencia comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y
- 10 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen  $V_H$  1-24 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1. La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva del gen  $V_H$  3-7 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1. La invención proporciona además un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen  $V_K$  L18 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1.
- 15 En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- (a) una región variable de la cadena pesada de un gen  $V_H$  1-24 o 3-7 humano; y
- (b) una región variable de la cadena ligera de un gen  $V_H$  L18 humano;
- 20 en la que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1.
- En una realización preferida, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de un gen  $V_H$  1-24 humano y una región variable de la cadena ligera de un gen  $V_K$  L18 humano. En otra realización preferida, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de un gen  $V_H$  3-7 humano y una región variable de la cadena ligera de un gen  $V_K$  L18 humano.
- 25 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 30 una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3; y en el que:
- (a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 y modificaciones conservadoras de las mismas;
- 35 (b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32 y modificaciones conservadoras de las mismas;
- (c) el anticuerpo se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos; y
- 40 (d) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación.
- Preferentemente, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28 y modificaciones conservadoras de las mismas. Preferentemente, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste
- 45

## ES 2 396 220 T3

en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24 y modificaciones conservadoras de las mismas.

5 Una combinación preferida comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 13;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 17;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 21;
- 10 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 25; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 29.

Otra combinación preferida comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 14;
- 15 (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 22;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 26; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 30.

Otra combinación preferida comprende:

- 20 (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 11;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 19;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 23;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 27; y
- 25 (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 31.

Otra combinación preferida comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 12;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 16;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20;
- 30 (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 24;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 32.

Una combinación preferida comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y
- 35 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

Otra combinación preferida comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Otra combinación preferida comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

Otra combinación preferida comprende:

- 5 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que compiten por la unión a SDF-1 con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

- 10 Los anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. De forma alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios.

- 15 La divulgación también proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, enlazado a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radioactivo. La divulgación también proporciona una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la divulgación, enlazado a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, inmunoconjugado o molécula biespecífica de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 La invención también engloba moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

- 25 La figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1D3. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 13) y CDR3 (SEQ ID NO: 17) y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1D3. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 25) y CDR3 (SEQ ID NO: 29) se representan y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

- 30 La figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 34) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1H2. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 14) y CDR3 (SEQ ID NO: 18) y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

- 35 La figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 38) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1H2. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 26) y CDR3 (SEQ ID NO: 30) y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

- 40 La figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 35) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1C6. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 15) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

- 45 La figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 39) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1C6. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 27) y CDR3 (SEQ ID NO: 31) y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

La figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2A5. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 16) y CDR3 (SEQ ID NO: 20) y se indican las derivaciones de línea germinal V, D y J.

- 50 La figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 40) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8)

de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2A5. Se representan las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 24), CDR2 (SEQ ID NO: 28) y CDR3 (SEQ ID NO: 32) y se indican las derivaciones de línea germinal V y J.

5 La figura 5 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1D3 (SEQ ID NO: 1) y 1H2 (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de línea germinal humana  $V_H$  1-24 (SEQ ID NO:41). La secuencia JH6b mostrada es la SEQ ID NO: 47.

La figura 6 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1C6 (SEQ ID NO: 3) y 2A5 (SEQ ID NO: 4) con la secuencia de aminoácidos de línea germinal humana  $V_H$  3-7 (SEQ ID NO: 42). La secuencia JH6b mostrada es la SEQ ID NO: 48.

10 La figura 7 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D3 (SEQ ID NO: 5) y 1H2 (SEQ ID NO: 6) con la secuencia de aminoácidos de línea germinal humana  $V_K$  L18 (SEQ ID NO: 43). La secuencia JK4 mostrada es la SEQ ID NO: 49.

15 La figura 8 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1C6 (SEQ ID NO: 7) y 2A5 (SEQ ID NO: 8) con la secuencia de aminoácidos de línea germinal humana  $V_K$  L18 (SEQ ID NO: 43). La secuencia JK1 mostrada es la SEQ ID NO: 50.

20 La figura 9 muestra los resultados de los experimentos de espectroscopía de fluorescencia y Biacore que demuestran la pérdida de dimerización de SDF-1 como función del tiempo tras la dilución en tampón PBS pero no en tampón PBS suplementado con  $CaCl_2$  1 mM. (A) Efecto del  $CaCl_2$  1 mM en la pérdida de dímeros de SDF-1 como función del tiempo tras la dilución, basado en medidas de anisotropía. (B) Efecto del  $CaCl_2$  1 mM sobre la pérdida de dímeros de SDF-1 en función del tiempo tras la dilución, basado en medidas de FRET.

La figura 10 muestra los resultados de experimentos que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1 boquean la unión de SDF-1 a células CEM.

La figura 11 muestra los resultados de experimentos que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1 boquean el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM.

25 La figura 12 muestra los resultados de experimentos que demuestran que anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1 boquean la migración de células CEM inducida por SDF-1.

La figura 13-1 muestra los resultados del tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-SDF-1 en artritis inducida por colágeno. (A) puntuación media, (B) anchura media de la pata.

30 La figura 13-2 muestra los resultados del tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-SDF-1 en artritis inducida por colágeno. (C) puntuación media en el día 15, (D) media de la pata (grosor) en el día 15.

La figura 13-3 muestra los resultados del tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-SDF-1 en artritis inducida por colágeno. (E) puntuación media de enfermedad, (F) puntuación media de enfermedad en el día 24.

35 La figura 14 muestra los resultados de experimentos de bolsa de aire *in vivo* que demuestran que anticuerpos anti-SDF-1 bloquean la migración hacia la bolsa de aire. (A) Medida del número total de células en la bolsa de aire. (B) Medida de neutrófilos en la bolsa de aire.

La figura 15 muestra los resultados de experimentos de bolsa de aire *in vivo* a dosis de administración más bajas de anticuerpo anti-SDF-1, que demuestran que anticuerpos anti-SDF-1 bloquean la migración de leucocitos hacia la bolsa de aire. (A) Medida del número total de células en la bolsa de aire. (B) Medida de neutrófilos en la bolsa de aire.

40 La figura 16 muestra los resultados de un estudio FMAT que demuestra la unión de anticuerpos anti-SDF-1 en células HuVEC. (A) Análisis FMAT de SDF-1a hr con anticuerpo 1C6. (B) Análisis FMAT de SDF-1a hr con anticuerpo 2A5. (C) Análisis FMAT de SDF-1a hr con anticuerpo I-CAM. (D) Análisis FMAT de SDF-1a hr con 1D3 y control negativo.

45 La figura 17 muestra los resultados de un ensayo de unión que muestra que anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1 boquean la unión de SDF-1 a células HuVEC.

#### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a SDF-1 con alta afinidad. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención derivan de secuencias de línea germinal de la cadena pesada y ligera en particular y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La invención proporciona anticuerpos aislados y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos de la invención. También se divulgan procedimientos de preparación de tales anticuerpos,

inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la divulgación. La divulgación también se refiere a procedimientos de uso de los anticuerpos, tales como para detectar SDF-1. La invención también se refiere a procedimientos de uso del anticuerpo para tratar enfermedades asociadas con la expresión de SDF-1, tales como neoplasias malignas que expresan CXCR4 y/o SDF-1, incluidos el cáncer de mama, neoplasias malignas de linfocitos B y tumores metastásicos. La invención se refiere además a procedimientos de uso de los anticuerpos para tratar trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA), o tratar el rechazo de trasplantes. La invención se refiere además a procedimientos de uso de los anticuerpos para tratar la retinopatía diabética proliferativa.

5 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar algunos términos/expresiones. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Los términos "factor 1 derivado de células estromales" y "SDF-1" se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especie del SDF-1 humano. En consecuencia, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden reaccionar de forma cruzada frente a cualquiera de las isoformas de SDF-1. Además, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden, en determinados casos, reaccionar de forma cruzada con SDF-1 de especies distintas del ser humano. En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden ser totalmente específicos para uno o más SDF-1 humanos y pueden no presentar reactividad cruzada de especies o no humana de otros tipos. La secuencia de aminoácidos completa de las isoformas alfa, beta y gamma de SDF-1 humano tiene los números de acceso de Genbank NP\_954637 (SEQ ID NO: 44), NP\_000600 (SEQ ID NO: 45) y NP\_001029058 (SEQ ID NO: 46), respectivamente.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, fagocitos, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o por el hígado (incluidos anticuerpos, citocinas y el complemento) que da lugar al daño selectivo de, la destrucción de, o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre diversas moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de una célula. Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor de SDF-1.

El término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas individuales del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada la cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada la cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., SDF-1). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo la pueden realizar fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión que se engloban en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento  $Fab'$ , que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento  $F_d$  que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento  $F_v$  que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento  $dAb$  (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento  $F_v$ ,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes distintos, se pueden unir usando procedimientos recombinantes mediante un enlazador sintético que permite que se produzcan

como una única cadena proteica en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv); véanse, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios se engloben dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y se analiza que los fragmentos sean útiles de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos.

Se pretende que un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiera a un anticuerpo que no tiene, sustancialmente, otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a SDF-1 no tiene, sustancialmente, anticuerpos que se unen a antígenos distintos de SDF-1). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a SDF-1 puede tener reactividad cruzada frente a otros antígenos, tales como moléculas de SDF-1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede no tener, sustancialmente, otros productos químicos y/o materiales celulares.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo en particular.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, en secuencias estructurales humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada y un transgén de la cadena ligera humanos fusionados con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de ellos (descrito en detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para que exprese el anticuerpo humano, p. ej., a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una colección de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el ajuste alternativo de secuencias de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos humanos recombinantes de este tipo tienen regiones variables en las que las regiones estructurales y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, se puede someter a tales anticuerpos humanos recombinantes a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias de línea germinal humana  $V_H$  y  $V_L$ , pueden no existir de forma natural en el repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que el término "anticuerpo humanizado" se refiera a anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, en secuencias estructurales humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región estructural dentro de las secuencias estructurales humanas.

Se pretende que el término "anticuerpo quimérico" se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de la región

variable derivan de una especie y las secuencias de la región constante derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante derivan de un anticuerpo humano.

5 Como se usa en el presente documento, se pretende que un anticuerpo que "se une específicamente a SDF-1 humano" se refiera a un anticuerpo que se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferentemente, de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente de  $3 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferentemente de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos.

10 La expresión "no se une sustancialmente" a una proteína o una célula, como se usa en el presente documento, significa que no se une o no se une con alta afinidad a la proteína o las células, es decir, se une a la proteína o las células con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-5}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-4}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-3}$  M o más, incluso más preferentemente de  $1 \times 10^{-2}$  M o más.

15 Se pretende que el término " $K_{asoc}$ " o " $K_a$ ", como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular, mientras que se pretende que el término " $K_{dis}$ " o " $K_d$ ", como se usa en el presente documento, se refiera a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular. Se pretende que el término " $K_D$ ", como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la proporción de  $K_d$  y  $K_a$  (es decir,  $K_d/K_a$ ) y se expresa como concentración molar (M). Se pueden determinar valor de  $K_D$  para anticuerpos usando procedimientos bien establecidos en la técnica. Un procedimiento preferido para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, preferentemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

20 Como se usa en el presente documento, el término "alta afinidad" para un anticuerpo de IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferentemente de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferentemente de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferentemente de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos e incluso más preferentemente de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos por un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o menos, más preferentemente de  $10^{-7}$  M o menos, incluso más preferentemente de  $10^{-8}$  M o menos.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

30 En las subsecciones siguientes se describen con más detalle diversos aspectos de la invención.

#### Anticuerpos anti-SDF-1

Los anticuerpos de la invención se caracterizan por características funcionales o propiedades de los anticuerpos particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a SDF-1 humano. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a SDF-1 con alta afinidad, por ejemplo con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos. 35 Preferentemente, los anticuerpos anti-SDF-1 de la invención presentan una o más de las características siguientes:

- (i) se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;
- (ii) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación;
- (iii) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;
- (iv) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;
- 40 (v) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1; o
- (vi) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

Preferentemente, el anticuerpo se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $4 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M o menos o se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos. 45

Preferentemente, el anticuerpo se une a un epítipo antigénico presente en SDF-1, epítipo que no está presente en otras proteínas. Normalmente, el anticuerpo se une a SDF-1 pero no se une a otras proteínas, o se une a otras proteínas con baja afinidad, tal como con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-5}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-4}$  M o más, más preferentemente de  $1 \times 10^{-3}$  M o más, incluso más preferentemente de  $1 \times 10^{-2}$  M o más. 50

En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos por SDF-1, incluidos, por ejemplo, análisis ELISA, Western blot, RIA y de citometría de flujo. En los ejemplos se describen con

detalle ensayos adecuados. También se puede evaluar la cinética de unión (p. ej., afinidad de unión) de los anticuerpos mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tal como mediante el sistema de análisis Biacore®.

### Anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5

5 Los anticuerpos de la invención preferidos son los anticuerpos monoclonales humanos 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de  $V_L$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

10 Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a SDF-1, las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  se pueden "mezclar y combinar" para crear otras moléculas de unión anti-SDF-1 de la invención. La unión a SDF-1 de tales anticuerpos "mezclados y combinados" se puede probar usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (p. ej., ELISA). Preferentemente, cuando se mezclan y combinan cadenas  $V_H$  y  $V_L$ , se reemplaza una secuencia  $V_H$  de un par  $V_H/V_L$  en particular con una secuencia  $V_H$  estructuralmente similar. Del mismo modo, preferentemente, una secuencia  $V_L$  de un par  $V_H/V_L$  en particular se reemplaza con una secuencia  $V_L$  estructuralmente similar.

15 En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4; y

(b) una región variable de la la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8;

20 en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1, preferentemente SDF-1 humano.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención tienen además una o más de las características siguientes:

(i) se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;

(ii) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación;

25 (iii) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;

(iv) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;

(v) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1; o

(vi) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

Las combinaciones de la cadena pesada y ligera preferidas incluyen:

30 (a) una región variable de la la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y  
(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o

(a) una región variable de la la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y  
(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o

35 (a) una región variable de la la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y  
(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; o

(a) una región variable de la la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y  
(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

40 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y ligera de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de  $V_H$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de  $V_H$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de  $V_H$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de  $V_K$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de  $V_K$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de  $V_K$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32. Las regiones CDR se representan usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH N.º: 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a SDF-1 y que la especificidad de unión a antígeno la

proporcionan, principalmente, las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_K$  se pueden "mezclar y combinar" (es decir, se pueden mezclar y combinar CDR de diferentes anticuerpos, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  y una CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_K$ ) para crear otras moléculas de unión anti-SDF-1 de la invención. La unión a SDF-1 de tales anticuerpos "mezclados y combinados" se puede probar usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (p. ej., ELISA, análisis Biacore<sup>®</sup>). Preferentemente, cuando se mezclan y combinan secuencias CDR de  $V_H$ , la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia  $V_H$  en particular se reemplaza con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Del mismo modo, cuando se mezclan y combinan secuencias CDR de  $V_K$ , la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia  $V_K$  en particular se reemplaza con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Resultará fácilmente evidente para el experto en la técnica que se pueden crear secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  novedosas sustituyendo una o más secuencias de región CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  por secuencias estructuralmente similares a las secuencias CDR divulgadas en el presente documento para los anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32;

en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1, preferentemente SDF-1 humano.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 13;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 17;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 21;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 25; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 29.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 14;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 22;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 26; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 30.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 11;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15;

- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 19;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 23;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 27; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 31.

5 En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 12;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 16;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 20;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 24;
- 10 (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 28; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 32.

En la técnica es bien sabido que el dominio CDR3, independientemente del/de los dominio(s) CDR1 y/o CDR2, puede determinar por sí solo la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno afín y que se pueden generar de forma predecible varios anticuerpos con la misma especificidad de unión basada en una secuencia CDR3 común. Véanse, por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo humanizado anti-CD30 usando sólo la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD30 Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describe anticuerpos frente a la glucoproteína epitelial recombinante 2 (EGP-2) usando sólo la secuencia de la CDR3 de la la cadena pesada del anticuerpo murino original MOC-31 anti-EGP-2); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un conjunto de anticuerpos humanizados anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$  usando un dominio CDR3 variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$  LM609 en el que cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y es capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo murino original con afinidades tan altas o más que las del anticuerpo murino original); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que divulga que el dominio CDR3 proporciona la mayor contribución a la unión a antígeno); Barbas *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de secuencias CDR3 de la cadena pesada de tres Fab (SI-1, SI-40 y SI-32) frente a ADN de placenta humana en la la cadena pesada de un Fab anti-toxide tetánico, reemplazando así la CDR3 de la cadena pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 por sí solo confería especificidad de unión); y Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (que describe estudios de injerto en los que la transferencia únicamente de la CDR3 de la cadena pesada de un Fab de LNA3 poliespecífico original a una cadena pesada de un Fab de un anticuerpo p313 de unión a toxide tetánico de IgG mono-específica, fue suficiente para mantener la especificidad de unión del Fab original).

En consecuencia, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un animal humano o no humano, en el que el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a SDF-1. En determinados aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o de rata, en el que el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a SDF-1. En algunas realizaciones, estos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión; (b) mantienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del anticuerpo no humano original correspondiente.

En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en el que el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a SDF-1. En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido a partir de un animal no humano, en el que el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a SDF-1 y en el que el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza a un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión por SDF-1 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a SDF-1. En algunas realizaciones, estos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión; (b) mantienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del primer anticuerpo humano original correspondiente. En realizaciones preferidas, el primer anticuerpo humano es 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5.

#### Anticuerpos que tienen secuencias de línea germinal particulares

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de la cadena pesada de línea germinal en particular y/o de un gen de inmunoglobulina de la cadena ligera de línea germinal en particular.

5 Por ejemplo, en una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen  $V_H$  1-24 humano, en la que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1. En otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva del gen  $V_H$  3-7 humano, en la que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1. En otra realización preferida más, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen  $V_K$  L18 humano, en la que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1. En otra realización preferida más, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en la que el anticuerpo:

15 (a) comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o deriva de un gen  $V_H$  1-24 o 3-7 (genes que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 41 y 42, respectivamente);

(b) comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o deriva de un gen  $V_K$  L18 (genes que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 43, respectivamente); y

(c) se une específicamente a SDF-1, preferentemente SDF-1 humano.

20 Son ejemplos de anticuerpos que tienen  $V_H$  y  $V_K$  de  $V_H$  1-24 y  $V_K$  L18, respectivamente, 1D3 y 1H2. Son ejemplos de anticuerpos que tienen  $V_H$  y  $V_K$  de  $V_H$  3-7 y  $V_K$  L18, respectivamente, 1C6 y 2A5.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención tienen además una o más de las características siguientes:

- (i) se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;
- (ii) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación;
- 25 (iii) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;
- (iv) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;
- (v) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1; o
- (vi) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

30 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de línea germinal en particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los sistemas de este tipo incluyen inmunizar un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o rastrear una colección de genes de inmunoglobulina humana presentados en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana más próxima en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana en particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debidas, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o a la introducción intencionada de mutaciones dirigidas a sitio. Sin embargo, normalmente, un anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácido que identifican el anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal humana de otras especies (p. ej., secuencias de línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana en particular no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

#### Anticuerpos homólogos

En otra realización más, un anticuerpo de la divulgación comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera

que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento, y en las que los anticuerpos mantienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-SDF-1 de la invención.

5 Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % homóloga con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4;

10 (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % homóloga con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8; y

(c) el anticuerpo se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos; y

(d) el anticuerpo se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

15 En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención tienen además una o más de las características siguientes:

(i) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;

(ii) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;

(iii) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1;

20 (iv) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  y/o  $V_L$  pueden ser un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones  $V_H$  y  $V_L$  con alta homología (es decir, 80 % o mayor) con las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de las secuencias expuestas anteriormente, se puede obtener por mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida a sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, seguida de probar el anticuerpo modificado codificado para evaluar su función mantenida (es decir, las funciones expuestas en (c) y (d) anteriormente, así como las funciones expuestas en (i)-(iv) anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

30 Como se usa en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología =  $n.^{\circ}$  de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$  total de posiciones  $\times$  100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes que figuran a continuación.

35 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático de GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

45 Adicionalmente o de forma alternativa, las secuencias proteicas de la presente invención se pueden usar además como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Estas búsquedas se pueden realizar usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

50 Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en las que una o más de estas secuencias CDR comprenden secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento (p. ej., 1D3,1H2,1C6 o 2A5), o modificaciones conservadoras de ellos, y en las que los anticuerpos mantienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-SDF-1 de la invención. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en el que:

- 5 (a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 y modificaciones conservadoras de las mismas;
- (b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32 y modificaciones conservadoras de las mismas; y
- 15 (c) el anticuerpo se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos; y
- (d) el anticuerpo se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención tienen además una o más de las características siguientes:

- 20 (i) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;
- (ii) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;
- (iii) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1;
- (iv) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28 y modificaciones conservadoras de las mismas. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24 y modificaciones conservadoras de las mismas.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "modificaciones conservadoras de secuencia" se refiera a modificaciones de aminoácidos que no afectan o modifican significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Estas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, se pueden reemplazar uno o más residuos de aminoácido de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención con otros residuos de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales y se puede probar el anticuerpo modificado para evaluar su función mantenida (es decir, las funciones expuestas en (c) y (d) anteriormente, así como las funciones expuestas en (i)-(iv) anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

La secuencia CDR1 de la cadena pesada de las SEQ ID NO: 9, 10, 11 o 12 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de secuencia, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR1 de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 21, 22, 23 o 24 puede

comprender una o más modificaciones conservadoras de secuencia, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de la cadena pesada mostrada en las SEQ ID NO: 13, 14, 15 o 16 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de secuencia, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de la cadena ligera mostrada en las SEQ ID NO: 25, 26, 27 o 28 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de secuencia, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos; y/o la secuencia CDR3 de la cadena ligera mostrada en las SEQ ID NO: 29, 30, 31 o 32 puede comprender una o más modificaciones conservadoras de secuencia, tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

#### **Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-SDF-1 de la invención**

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo de SDF-1 humano que cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir de forma cruzada por la unión a SDF-1 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 1D3 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_L$  como se muestra en las SEQ ID NO: 1 y 5, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 1H2 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_L$  como se muestra en las SEQ ID NO: 2 y 6, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 1C6 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_L$  como se muestra en las SEQ ID NO: 3 y 7, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 2A5 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_L$  como se muestra en las SEQ ID NO: 4 y 8, respectivamente). Estos anticuerpos de competición cruzada se pueden identificar basándose en su capacidad para competir de forma cruzada con 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5 en ensayos estándar de unión a SDF-1. Por ejemplo, se pueden usar análisis BIAcore<sup>®</sup>, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar la competición cruzada con los anticuerpos de la presente invención. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5, a SDF-1 humano, demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5 por la unión a SDF-1 humano y, por tanto, se une al mismo epítipo en SDF-1 humano que 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en SDF-1 humano que 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5 es un anticuerpo monoclonal humano. Estos anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en los ejemplos.

#### **Anticuerpos diseñados y modificados**

Se puede usar como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, el cual puede presentar propiedades modificadas en comparación con el anticuerpo de partida, un anticuerpo de la invención que se puede preparar además usando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_L$  divulgadas en el presente documento. Un anticuerpo se puede diseñar modificando uno o más de los aminoácidos del interior de una o más regiones variables (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo, del interior de una o más regiones CDR y/o del interior de una o más regiones estructurales. Adicionalmente o de forma alternativa, se puede diseñar un anticuerpo modificando residuos del interior de las regiones constantes, por ejemplo, para modificar las funciones efectoras del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, se pueden usar injertos de CDR para diseñar regiones variables de anticuerpos. De manera predominante, los anticuerpos interaccionan con antígenos objetivo a través de residuos de aminoácidos que se sitúan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos del interior de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias de fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, se pueden expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertadas en secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, p. ej., Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; la patente de EE. UU. N.º 5.225.539 de Winter, y las patentes de EE. UU. N.º 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

En consecuencia, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16, y las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24, las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28, y las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32, respectivamente. Por tanto, estos anticuerpos contienen las secuencias CDR de  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5, aunque pueden contener diferentes secuencias estructurales de estos anticuerpos.

Estas secuencias estructurales se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de la cadena pesada y ligera en la base de

datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de regiones variables de la cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal humana de la cadena pesada que se encuentran en el HuMAb de ratón HCo7 están disponibles en los números de acceso de Genbank adjuntos: 1-69 (NG\_010109, NT\_024637 y BC070333), 3-33 (NG\_0010109 y NT\_024637) y 3-7 (NG\_0010109 y NT\_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de línea germinal humana de la cadena pesada que se encuentran en el HuMAb de ratón HCo12 están disponibles en los números de acceso de Genbank adjuntos: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 y BC070333), 5-51 (NG\_0010109 y NT\_024637), 4-34 (NG\_0010109 y NT\_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias proteicas de los anticuerpos se comparan frente a una base de datos de secuencias proteicas compiladas usando uno de los procedimientos de búsqueda de similitud de secuencia denominado Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que es bien conocido por los expertos en la técnica. BLAST es un algoritmo heurístico en cuanto a que es probable que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos contenga pares de segmentos de palabras alineadas de puntuación alta (HSP). Los pares de segmentos cuya puntuación no se puede mejorar mediante extensión o recorte se denominan *aciertos*. Brevemente, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) se traducen y se mantiene la región comprendida y que incluye la región estructural FR1 a la FR3. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Se eliminan secuencias duplicadas que son coincidencias exactas en toda la longitud de la proteína. Una búsqueda BLAST de proteínas usando el programa blastp con parámetros estándar por defecto, excepto el filtro de baja complejidad, que se desactiva, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra las 5 coincidencias de secuencia que más aciertos proporcionan. Las secuencias de nucleótidos se traducen en los seis marcos y el marco sin codones de detención en el segmento coincidente de la secuencia de bases de datos se considera el acierto potencial. Esto se confirma a su vez usando del programa tblastx de BLAST, que traduce la secuencia del anticuerpo en los seis marcos y compara esas traducciones con las secuencias de nucleótidos de VBASE traducidas de forma dinámica en los seis marcos.

Las identidades son coincidencias exactas de aminoácidos entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de proteínas en toda la longitud de la secuencia. Los positivos (identidades + coincidencia de sustitución) no son idénticos, sino sustituciones de aminoácidos guiadas por la matriz de sustitución de BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo coincide con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, se decidiría que el acierto con más positivos es el acierto que coincide con la secuencia.

Las secuencias estructurales preferidas para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias estructurales usadas por anticuerpos seleccionados de la invención, p. ej., similares a las secuencias estructurales de V<sub>H</sub> 1-24 (SEQ ID NO: 41) y/o las secuencia estructurales de V<sub>H</sub> 3-7 (SEQ ID NO: 42) y/o las secuencia estructurales de V<sub>K</sub> L18 (SEQ ID NO: 43) usadas por anticuerpos monoclonales de la invención preferidos. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>H</sub> y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V<sub>K</sub>, se pueden injertar en regiones estructurales que tienen una secuencia idéntica a la que se encuentra en el gen de inmunoglobulina de línea germinal del que deriva la secuencia estructural, o se pueden injertar las secuencias CDR en regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que, en determinados casos, es beneficioso mutar residuos del interior de las regiones estructurales para mantener o potenciar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de la región variable es la mutación de residuos de aminoácido del interior de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V<sub>H</sub> y/o V<sub>K</sub> para, de este modo, mejorar una o más propiedades de unión (p. ej., afinidad) del anticuerpo de interés. Se puede realizar mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la(s) mutación(es) y se puede evaluar el efecto en la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los ejemplos. Preferentemente, se introducen modificaciones conservadoras (como se analiza anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Además, normalmente, no se modifican más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos del interior de una región CDR.

En consecuencia, en otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V<sub>H</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12; (b) una región CDR2 de V<sub>H</sub> que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones,

deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16; (c) una región CDR3 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20; (d) una región CDR1 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24; (e) una región CDR2 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28; y (f) una región CDR3 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32.

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los que las modificaciones se han realizado en residuos estructurales del interior de  $V_H$  y/o  $V_K$ , p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones estructurales se realizan para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos estructurales a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos estructurales que difieren de la secuencia de línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Los residuos de este tipo se pueden identificar comparando las secuencias estructurales del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que deriva el anticuerpo.

Como otro ejemplo más, para 2A5, el residuo de aminoácido n.º 1 (del interior de la FR1) de  $V_H$  es una glutamina (SEQ ID NO: 4) mientras que este residuo en la secuencia de línea germinal de  $V_H$  3-7 correspondiente es un ácido glutámico (SEQ ID NO: 42). Para devolver las secuencias de región estructural a su configuración de línea germinal, por ejemplo, se puede "retromutar" el residuo n.º 1 del interior de la FR1 de la  $V_H$  de 2A5 de glutamina a ácido glutámico.

Como otro ejemplo más, para 2A5, el residuo de aminoácido n.º 6 (del interior de la FR1) de  $V_H$  es una glutamina (SEQ ID NO: 4) mientras que este residuo en la secuencia de línea germinal de  $V_H$  3-7 correspondiente es un ácido glutámico (SEQ ID NO: 42). Para devolver las secuencias de región estructural a su configuración de línea germinal, por ejemplo, se puede "retromutar" el residuo n.º 6 del interior de la FR1 de la  $V_H$  de 2A5 de glutamina a ácido glutámico.

Por ejemplo, la tabla 1 que figura a continuación muestra una serie de cambios de aminoácidos en las regiones estructurales de los anticuerpos anti-SDF-1 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 que difieren de la secuencia de línea germinal original de la cadena pesada. Para devolver uno o más de los residuos de aminoácidos de las secuencias de región estructural a su configuración de línea germinal, se pueden "retromutar" las mutaciones somáticas a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR.

Como otro ejemplo, la tabla 2 que figura a continuación muestra una serie de cambios de aminoácidos en las regiones estructurales de los anticuerpos anti-SDF-1 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 que difieren de la secuencia de línea germinal original de la cadena ligera. Para devolver uno o más de los residuos de aminoácidos de las secuencias de región estructural a su configuración de línea germinal, se pueden "retromutar" las mutaciones somáticas a la secuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR.

La alineación de las regiones  $V_H$  de 1D3 y 1H2 frente a la secuencia  $V_H$  1-24 de línea germinal original (SEQ ID NO: 41) se muestra en la figura 6. La alineación de regiones  $V_H$  de 1C6 y 2A5 frente a la secuencia  $V_H$  3-7 de línea germinal original (SEQ ID NO: 42) se muestra en la figura 7. La alineación de regiones  $V_K$  de 1D3 y 1H2 frente a la secuencia  $V_K$  L18 de línea germinal original (SEQ ID NO: 43) se muestra en la figura 7. La alineación de regiones  $V_K$  de 1C6 y 2A5 frente a la secuencia  $V_K$  L18 de línea germinal original (SEQ ID NO: 43) se muestra en la figura 8.

Tabla 1. Modificaciones de los anticuerpos 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 con respecto a la configuración de línea germinal de la cadena pesada.

| Ac anti-SDF-1 | Posición del aminoácido | Aminoácido del anticuerpo | Aminoácido original de la configuración de línea germinal |
|---------------|-------------------------|---------------------------|---|
| 1D3           | 1                       | E                         | Q   |
|               | 84                      | T                         | S   |
| 1H2           | 29                      | F                         | L   |
|               | 117                     | M                         | T   |
| 1C6           | 9                       | R                         | G   |
| 2A5           | 1                       | Q                         | E   |
|               | 6                       | Q                         | E   |

5 Tabla 2. Modificaciones de los anticuerpos 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 con respecto a la configuración de línea germinal de la cadena ligera.

| Ac anti-SDF-1 | Posición del aminoácido | Aminoácido del anticuerpo | Aminoácido original de la configuración de línea germinal |
|---------------|-------------------------|---------------------------|---|
| 1D3           | 1                       | E                         | A   |
|               | 3                       | V                         | Q   |
| 1H2           | 1                       | E                         | A   |
|               | 3                       | V                         | Q   |
| 1C6           | 3                       | R                         | Q   |
|               | 4                       | M                         | L   |
|               | 11                      | V                         | L   |
|               | 39                      | T                         | K   |
| 2A5           | 1                       | D                         | A   |
|               | 4                       | M                         | L   |
|               | 5                       | I                         | T   |

10 Otro tipo de modificación estructural implica mutar uno o más residuos del interior de la región estructural, o incluso del interior de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de células T para, de este modo, reducir la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20030153043, por Carr *et al.*

15 Además de o como alternativa a las modificaciones realizadas en el interior de las regiones estructurales o CDR, se pueden diseñar los anticuerpos de la invención para incluir modificaciones en el interior de la región Fc, normalmente para modificar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (p. ej., se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para modificar su glucosilación, de nuevo para modificar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los residuos de la región Fc es la del índice EU de Kabat.

20 En una realización, se modifica la región bisagra de CH1 de forma que se modifica, p. ej., aumenta o disminuye, el número de residuos de cisteína de la región bisagra. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. N.º 5.677.425 por Bodmer *et al.* El número de residuos de cisteína de la región bisagra de CH1 se modifica, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

25 En otra realización, la región bisagra de Fc del anticuerpo se muta para reducir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácido en la región de interfaz de los dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra-Fc, de forma que el anticuerpo presenta una unión deficiente a la proteína estafilocócica A (SpA) con relación a la unión a SpA del dominio nativo Fc-bisagra. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. N.º 6.165.745 por Ward *et al.*

En otra realización, se modifica el anticuerpo para aumentar su semivida biológica. Se contemplan diversos

enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las mutaciones siguientes: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 6.277.375 de Ward. De forma alternativa, para aumentar la semivida biológica, se puede modificar el anticuerpo en el interior de la región CH1 o C<sub>L</sub> para que contenga un epítipo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE. UU. N.º 5.869.046 y 6.121.022 por Presta *et al.*

En otras realizaciones adicionales, se modifica la región Fc reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para modificar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 con un residuo de aminoácido diferente, de forma que el anticuerpo tiene una afinidad modificada por un ligando efector pero mantiene la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector por el que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter *et al.*

En otro ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácido 329, 331 y 322 con un residuo de aminoácido diferente, de forma que el anticuerpo presenta una unión a C1q modificada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. N.º 6.194.551 por Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, se modifican uno o más residuos de aminoácido de las posiciones 231 y 239 para, de este modo, modificar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe con más detalle en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

En otro ejemplo más, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe con más detalle en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase, Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se demostró que los siguientes mutantes combinados mejoran la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). También se puede modificar la glucosilación para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Las modificaciones de hidratos de carbono de este tipo se pueden lograr, por ejemplo, modificando uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o más sitios de glucosilación estructurales de la región variable para, de este modo, eliminar la glucosilación en ese sitio. Esta aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. N.º 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al.*

Adicionalmente o de forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo que presenta un tipo de glucosilación modificada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que presenta un aumento de estructuras de GlcNac bisectoras. Se ha demostrado que los patrones de glucosilación modificados de este tipo aumentan la capacidad de CCDA de los anticuerpos. Estas modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glucosilación modificada. En la técnica se han descrito células con maquinaria de glucosilación modificada y se pueden usar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para, de este modo, producir un anticuerpo con glucosilación modificada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen fucosiltransferasa, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferasa), de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas celulares FUT8<sup>-/-</sup> Ms704, Ms705 y Ms709 se crearon mediante alteración dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véanse la publicación de patente de EE. UU. N.º 20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de forma que los anticuerpos expresados en una línea celular de este tipo presentan hipofucosilación mediante la reducción o la eliminación de la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai *et al.* también describen líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de línea celular CHO, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a hidratos de carbono enlazados a Asn(297), dando lugar también a la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* describe líneas celulares diseñadas para que expresen glucosiltransferasas modificadoras de glicoproteínas

(p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas presentan un aumento de estructuras de GlcNac bisectoras que da lugar a un aumento de la actividad CCD4 de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). De forma alternativa, se pueden eliminar por escisión los residuos de fucosa del anticuerpo usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina residuos de fucosilo de anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos del presente documento que contempla la invención es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Normalmente, para pegar un anticuerpo, se hace reaccionar el anticuerpo, o fragmentos del mismo, con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "polietilenglicol" englobe cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi o ariloxi (C1-C10)-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se quiere pegar es un anticuerpo aglucosilado. En la técnica se conocen procedimientos para pegar proteínas y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* y el documento EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

### Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden caracterizar adicionalmente por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-SDF-1. Se pueden usar diversos ensayos para detectar y/o diferenciar distintas clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glucosilación en la región variable tanto de la cadena ligera como pesada. La presencia de uno o más sitios de glucosilación en la región variable puede dar lugar a un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o a una modificación del pK del anticuerpo debido a la modificación de la unión a antígeno (Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe que la glucosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. Se puede probar la glucosilación de la región variable usando un ensayo Glycoblot, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y después prueba la glucosilación usando un ensayo que mide la oxidación de peryodato y la formación de base de Schiff. De forma alternativa, se puede probar la glucosilación de la región variable usando cromatografía líquida de Dionex (Dionex-LC), que escinde sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido individual en sacáridos. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-SDF-1 que no contenga glucosilación de la región variable. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glucosilación en la región variable o mutando residuos del interior del motivo de glucosilación usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomería de asparagina. Se puede producir una desaminación o un efecto de ácido isoaspártico en secuencias N-G o D-G, respectivamente. La desaminación o efecto de ácido isoaspártico da lugar a la creación de ácido isoaspártico, lo que reduce la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura retorcida a partir del extremo carboxilo de una cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico se puede medir usando un ensayo de isocuantificación, que usa una HPLC en fase inversa para detectar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico (pI) único, pero en general, los anticuerpos se encontrarán en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI de un anticuerpo de IgG1 se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo de IgG4 se encuentra normalmente en el intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que se encuentre fuera de este intervalo. Aunque en general se desconocen los efectos, se especula con que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden presentar algo de desplegado e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico se puede probar usando un ensayo de enfoque isoeléctrico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque láser para aumentar la precisión (Janini *et al.* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatography* 53:S75-89; Hunt *et al.* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-SDF-1 que contenga un valor de pI que se encuentre dentro del intervalo normal. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal o mutando residuos de superficie cargados usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una mayor estabilidad térmica indica una mayor estabilidad general del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando técnicas tales como la calorimetría diferencial de barrido (Chen *et al.* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). La  $T_{M1}$  indica la temperatura del desplegado inicial del anticuerpo. La  $T_{M2}$  indica la temperatura del desplegado completo del anticuerpo. En general, se prefiere que la  $T_{M1}$  de un anticuerpo de la presente invención sea superior a

60 °C, preferentemente superior a 65 °C, incluso más preferentemente superior a 70 °C. De forma alternativa, la estabilidad térmica de un anticuerpo se puede medir usando dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

5 En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-SDF-1 se puede medir usando electroforesis capilar (EC) y MALDI-EM, ya que se entienden bien en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

10 En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir a que se desencadene una respuesta inmunitaria no deseada y/o a propiedades farmacocinéticas modificadas o desfavorables. En general, son aceptables anticuerpos con agregación del 25 % o menos, preferentemente del 20 % o menos, incluso más preferentemente del 15 % o menos, incluso más preferentemente del 10 % o menos e incluso más preferentemente del 5 % o menos. Se puede medir la agregación mediante varias técnicas bien conocidas en la técnica, incluida la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna de exclusión por tamaño (SEC) y la dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

### Procedimientos de diseño de anticuerpos

15 Como se analiza anteriormente, los anticuerpos anti-SDF-1 que tienen secuencias  $V_H$  y  $V_K$  divulgadas en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti-SDF-1 modificando las secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$ , o la(s) región(es) constante(s) unidas a ellas. Así, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de un anticuerpo anti-SDF-1 de la divulgación, p. ej., 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5, se usan para crear anticuerpos anti-SDF-1 relacionados estructuralmente que mantienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la divulgación, tal como la unión a SDF-1 humano. Por ejemplo, se pueden combinar de forma recombinante una o más regiones CDR de 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5, o mutaciones de las mismas, con regiones estructurales conocidas y/u otras regiones CDR para crear anticuerpos anti-SDF-1 de la invención adicionales diseñados de forma recombinante, como se analiza anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el procedimiento de diseño es una o más secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. En su lugar, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y después se prepara(n) y se expresa(n) como una proteína la(s) secuencia(s) de "segunda generación".

En consecuencia, en otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-SDF-1 que comprende:

35 (a) proporcionar: (i) una secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 14, 15 y 16, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20; y/o (ii) una secuencia de la región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22, 23 y 24, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 25, 26, 27 y 28, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29, 30, 31 y 32;

40 (b) modificar al menos un residuo de aminoácido del interior de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera de anticuerpo para crear al menos una secuencia de anticuerpo modificada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo modificada como una proteína.

45 Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo modificada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo modificada(s) es uno que mantiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-SDF-1 descritos en el presente documento, propiedades funcionales que incluyen, entre otras:

- (a) se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;
- 50 (b) se une a SDF-1 nativo humano mediante un ensayo de inmunoprecipitación;
- (c) bloquea la unión de SDF-1 a células CEM;
- (d) bloquea el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM;
- (e) bloquea la migración de células CEM inducida por SDF-1; o

(f) bloquea la formación de tubos capilares en células HuVEC.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos modificados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tales como los expuestos en los ejemplos (p. ej., citometría de flujo, ensayos de unión).

- 5 En determinadas realizaciones de los procedimientos de genomanipulación de anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria o selectiva a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante de un anticuerpo anti-SDF-1 y se pueden rastrear los anticuerpos anti-SDF-1 modificados resultantes para detectar actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. En la técnica se han descrito procedimientos mutacionales. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 por Short describe procedimientos para crear y rastrear mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis por saturación, ensamblaje sintético de ligación o una combinación de las mismas. De forma alternativa, la publicación PCT WO 10 03/074679 por Lazar *et al.* describe procedimientos de uso de procedimientos de rastreo por ordenador para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

### Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se hace sustancialmente puro" cuando se separa por purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluidas tratamiento alcalino/con SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una 20 realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

- 25 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándar de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (p. ej., hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana como se describe con más detalle a continuación), se pueden obtener ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo formado por el hibridoma mediante técnicas de amplificación por PCR o de clonación de ADN. Para anticuerpos obtenidos a partir de una colección de genes de inmunoglobulina (p. ej., usando técnicas de presentación en fagos), se puede recuperar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo a 30 partir de la colección.

- Las moléculas de ácido nucleico de la invención preferidas son las que codifican las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias  $V_H$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 33, 34, 35 y 36, respectivamente. Las secuencias de ADN que 35 codifican las secuencias  $V_L$  de 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 se muestran en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40, respectivamente.

- Otros ácidos nucleicos de la divulgación preferidos son ácidos nucleicos que tienen al menos el 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia, con una de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo.

- 40 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos es el número de posiciones de la secuencia en las que el nucleótido es idéntico, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que deben introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo de Meyers y Miller o el programa XBLAST de Altschul descrito anteriormente.

- 45 Además, los ácidos nucleicos preferidos de la divulgación comprenden una o más porciones codificantes de CDR de las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40. En esta realización, el ácido nucleico puede codificar la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada de 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5 o la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera de 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5.

- 50 Los ácidos nucleicos que tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, de identidad con una porción codificante de CDR de este tipo de las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 también son ácidos nucleicos de la divulgación preferidos. Estos ácidos nucleicos pueden diferir de la porción correspondiente de las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 en una región no codificante de CDR y/o en una región codificante de CDR. Cuando la diferencia está en una región codificante de CDR, la región de CDR de ácido nucleico codificada por el ácido nucleico comprende normalmente una o más 55 modificaciones conservadoras de secuencia como se define en el presente documento en comparación con la secuencia CDR correspondiente de 1D3, 1H2, 1C6 o 2A5.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos  $V_H$  y  $V_L$ , estos fragmentos de ADN se

pueden manipular adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, se enlaza de forma funcional un fragmento de ADN que codifica  $V_L$  o  $V_H$  a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Se pretende que la expresión "enlazado de forma funcional", como se usa en el presente contexto, signifique que dos fragmentos de ADN están unidos de forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por ambos fragmentos de ADN permanecen en marco.

El ADN aislado que codifica la región  $V_H$  se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa enlazando de forma funcional el ADN que codifica la  $V_H$  a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). En la técnica se conocen las secuencias de genes de regiones constantes de la cadena pesada humanas (véase, p. ej., Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edición, U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, publicación del NIH N.º 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que engloban estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferentemente, es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica la  $V_H$  se puede enlazar de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región  $V_L$  se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de la cadena ligera Fab) enlazando de forma funcional el ADN que codifica la  $V_L$  a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera,  $C_L$ . En la técnica se conocen las secuencias de genes de regiones constantes de la cadena ligera humanos (véase, p. ej., Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH N.º 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que engloban estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de la cadena pesada puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican la  $V_H$  y la  $V_L$  se enlazan de forma funcional a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos  $(Gly_4-Ser)_3$  (SEQ ID NO: 51), de forma que las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  se pueden expresar como una única proteína monocatenaria contigua, con las regiones  $V_L$  y  $V_H$  unidas por el enlazador flexible (véanse, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

### Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (Acm) de la presente invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, p. ej., transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratón es un procedimiento bien establecido. En la técnica se conocen protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (p. ej., células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión.

Se pueden preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma no humano de interés y diseñarse para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (p. ej., humanas) usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, se pueden enlazar regiones variables murinas a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en una estructural humana usando procedimiento conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.225.239 de Winter, y las patentes de EE. UU. N.º 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Estos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra SDF-1 se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de porciones del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento HuMAB Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup>, respectivamente, y se denominan conjuntamente "ratones de Ig humana".

El HuMAB Mouse<sup>®</sup> (Medarex<sup>®</sup>, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana de la cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  (véase, p. ej., Lonberg, *et al.* (1994) *Nature*

368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones presentan una disminución de la expresión de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de la cadena pesada y ligera introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgGκ humana de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del HuMAb Mouse<sup>®</sup> y las modificaciones genómicas llevadas a cabo mediante ratones de este tipo se describen con más detalle en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; *Choietal.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además las patentes de EE. UU. N.º 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.877.397, 5.661.016, 5.814.318, 5.874.299 y 5.770.429, todas de Lonberg y Kay; la patente de EE. UU. N.º 5.545.807 de Surani *et al.*; las publicaciones PCT N.º WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT N.º. WO 01/14424 de Korman *et al.*

En otra realización, se pueden obtener anticuerpos humanos de la invención usando un ratón portador de secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón portador de un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento "KM mouse<sup>®</sup>", se describe con más detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

Además, en la técnica se dispone de sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-SDF-1 de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dicho ratón se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.939.598, 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.*

Además, en la técnica se dispone de sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-SDF-1 de la invención. Por ejemplo, se pueden usar ratones portadores tanto de un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; estos ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas portadoras de transcromosomas de la cadena pesada y ligera humanas (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden usar para obtener anticuerpos anti-SDF-1 de la invención.

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la invención usando procedimientos de presentación en fagos para rastrear colecciones de genes de inmunoglobulina humana. Estos procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: las patentes de EE. UU. N.º 5.223.409, 5.403.484 y 5.571.698 de Ladner *et al.*; las patentes de EE. UU. N.º 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; las patentes de EE. UU. N.º 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*; y las patentes de EE. UU. N.º 5.885.793, 6.521.404, 6.544.731, 6.555.313, 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*

También se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la invención usando ratones IDCG en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de forma que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Estos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

### Inmunización de ratones de Ig humana

Cuando se usan ratones de Ig humana para obtener anticuerpos humanos de la invención, se pueden inmunizar tales ratones con una preparación purificada o enriquecida de antígeno de SDF-1 y/o SDF-1 recombinante, o células que expresan SDF-1, o una proteína de fusión de SDF-1, como se describe por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y las publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) de antígeno de SDF-1 para inmunizar a los ratones de Ig humana por vía intraperitoneal.

En el ejemplo 1 que figura a continuación se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a SDF-1. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada semana (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también se ha descubierto que adyuvantes distintos del de Freund son eficaces. Además, se ha descubierto que las células completas en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. Se puede realizar un seguimiento de la respuesta inmunitaria a lo largo del curso del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. Se puede rastrear el plasma mediante ELISA (como se describe a continuación) y se pueden usar ratones con valoraciones de

inmunoglobulina humana anti-SDF-1 suficientemente altas para fusiones. A los ratones se les puede administrar refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 días antes de sacrificarlos y retirarles el bazo. Se calcula que puede ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Normalmente, se inmunizan entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Habitualmente, se usan las cepas HCo7 y HCo12. Además, ambos transgenes HCo7 y HCo12 se pueden reproducir juntos en un único ratón con dos transgenes diferentes de la cadena pesada humana (HCo7/HCo12). De forma alternativa o adicionalmente, se puede usar la cepa KM Mouse<sup>®</sup>, como se describe en el ejemplo 1.

#### Generación de colecciones combinatorias de presentación en fagos y rastreo

Se construyeron colecciones de ADNc iniciales de regiones variables de anticuerpos con los bazos de HuMAb mouse<sup>®</sup> o KM mouse<sup>®</sup> inmunizados con SDF-1. Después, se clonaron las regiones variables de anticuerpo en vectores de expresión de fago. Se realizó la selección en fagos usando el procedimiento de selección en fagos Omniclonal<sup>®</sup> (Biosite Inc, San Diego, CA) con SDF-1 biotinilado para rastrear fragmentos de la región variable con afinidad nanomolar (bazo de KM) o afinidad subnanomolar (bazo de HuMAb). Los fragmentos de la región variable de interés se vuelven a clonar en un vector de expresión de Fab y se vuelve a probar el Fab para evaluar la afinidad de unión y la afinidad funcional. La porción N-terminal de la región variable, que se codificó con un cebador, se retomó a la secuencia de línea germinal para cada región variable. Después, se generaron anticuerpos completos a partir de los Fab anti-SDF-1 de alta afinidad usando técnicas estándar de biología molecular.

#### Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar esplenocitos y/o células de ganglio linfático de ratones inmunizados y fusionarlos con una línea celular inmortalizada adecuada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden rastrear para producir anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50 %. De forma alternativa, la suspensión unicelular de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se puede fusionar usando un procedimiento de electrofusión basado en campo eléctrico, usando un electroporador de fusión celular de cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). Se plaquean las células aproximadamente a  $2 \times 10^5$  en una placa de microvaloración de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero clonal al 20 %, medio condicionado "653" al 18 %, origen al 5 % (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1x (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, se pueden cultivar las células en medio en el que se reemplaza el HAT con HT. Después, se pueden rastrear pocillos individuales mediante ELISA para detectar anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Una vez se produce el crecimiento extenso del hibridoma, se puede observar el medio habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden volver a plaquear, rastrearse de nuevo y, si siguen siendo positivos para IgG humana, se pueden subclonar los anticuerpos monoclonales al menos dos veces mediante dilución limitante. Después, se pueden cultivar los subclones estables *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, se pueden hacer crecer hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Se pueden filtrar los sobrenadantes y concentrarlos antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Se puede comprobar la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución tamponadora se puede cambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden alicuotar y almacenar a -80 ° C.

#### Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

Se pueden producir anticuerpos de la invención en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica, como se conoce bien en la técnica (p. ej., Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa mediante técnicas estándar de biología molecular (p. ej., amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y se pueden insertar los ADN en vectores de expresión de forma que los genes se enlazan de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que la expresión "enlazado de manera funcional" signifique que el gen de un anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional del interior del vector realizan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión

mediante procedimientos estándar (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector o unión de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y constantes de la cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento  $V_H$  se enlaza de manera funcional al/a los segmento(s)  $C_H$  del interior del vector y el segmento  $V_K$  se enlaza de manera funcional al segmento  $C_L$  del interior del vector. Adicionalmente o de forma alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se enlaza en marco con el extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. De forma alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la  $\beta$ -globina. Además, elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes orígenes, tales como el sistema promotor  $SR\alpha$ , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células T humanas de tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la duplicación del vector en células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el/los vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" engloben una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferentemente en células huésped de mamíferos, es lo más preferido debido a que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamíferos, tienen más probabilidad que las células procariontas de ensamblar y secretar un anticuerpo plegado de manera apropiada e inmunológicamente activo. Se ha informado de que la expresión procarionta de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, p. ej., como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido en el sistema de expresión génica GS divulgado en los documentos WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338.841 (de Bebbington). Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamíferos, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Se pueden recuperar los anticuerpos del medio de cultivo usando procedimientos estándar de purificación de proteínas.

## 60 Caracterización de la unión a antígeno de los anticuerpos

Se puede probar la unión de anticuerpos de la invención a SDF-1, por ejemplo, mediante ELISA estándar.

5 Brevemente, se recubren placas de microtitulación con SDF-1 purificado a 0,25 µg/ml en PBS, y después de bloquean con seroalbúmina bovina al 5 % en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpo (p. ej., diluciones de plasma de ratones inmunizados con SDF-1) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Se lavan las placas con PBS/Tween y después se incuban con un reactivo secundario (p. ej., para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal de cabra anti-IgG humana específico de Fc) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, se revelan las placas con sustrato pNPP (1 mg/ml) y se analizan a una DO de 405-650. Preferentemente, se usan para fusiones los ratones que desarrollan los mayores títulos.

10 También se puede usar un ensayo ELISA como se describe anteriormente para rastrear hibridomas que muestran reactividad positiva con inmunógeno de SDF-1. Los hibridomas que se unen con alta avidéz a SDF-1 se subclonan y se caracterizan adicionalmente. Para cada hibridoma, se puede elegir un clon, que mantiene la reactividad de las células originales (mediante ELISA), para preparar un banco de células de 5-10 viales almacenado a -140 °C, y para purificar anticuerpos.

15 Para purificar anticuerpos anti-SDF-1, se pueden hacer crecer hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Se pueden filtrar los sobrenadantes y concentrarlos antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se puede comprobar la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución tamponadora se puede cambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden alicuotar y almacenar a -80 °C.

20 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 seleccionados se unen a epítomos únicos, se puede biotinilar cada anticuerpo usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Se pueden realizar estudios de competición usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados usando placas de ELISA recubiertas con SDF-1 como se describe anteriormente. La unión de Acm biotinilados se puede detectar con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

25 Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipo usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo en particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, se pueden recubrir pocillos de placas de microvaloración con 1 µg/ml de anti-inmunoglobulina humana durante la noche a 4 °C. Después de bloquearlas con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante de una a dos horas. Después, se pueden hacer reaccionar los pocillos con sondas específicas de IgG1 humana o IgM humana conjugadas con fosfatasa alcalina. Las placas se revelan y se analizan como se describe anteriormente.

30 Las IgG humanas anti-SDF-1 se pueden probar adicionalmente para evaluar su reactividad con antígeno de SDF-1 mediante transferencia de bandas western. Brevemente, se puede preparar SDF-1 y someterlo a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero bovino fetal al 10 % y se sondan con los anticuerpos monoclonales que se van a probar. La unión a IgG humana se puede detectar usando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

35 También se puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo de la invención realizando un seguimiento de la unión del anticuerpo a células que expresan SDF-1, por ejemplo, por citometría de flujo. Normalmente, se puede transfectar una línea celular, tal como una línea celular CHO, con un vector de expresión que codifica una forma transmembranaria de SDF-1. La proteína transfectada puede comprender una marca, tal como una marca myc, preferentemente en el extremo N-terminal, para su detección usando un anticuerpo frente a la marca. Se puede determinar la unión de un anticuerpo de la invención a SDF-1 incubando las células transfectadas con el anticuerpo y detectando el anticuerpo unido. Se puede usar como control positivo la unión de un anticuerpo a la marca de la proteína transfectada.

40 La especificidad de un anticuerpo de la invención por SDF-1 se puede estudiar con más detalle determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas usando los mismos procedimientos mediante los que se determina la unión a SDF-1.

#### **Inmunconjugados**

50 En otro aspecto, la presente divulgación muestra un anticuerpo anti-SDF-1, o uno de sus fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Estos conjugados se denominan en el presente documento "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (p. ej., que las destruya). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej.,

5 metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamino platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (anteriormente, actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está comercialmente disponible (Mylotarg<sup>®</sup>; American Home Products).

10 Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazadores disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, entre otros, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede escoger un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por pH bajo en el interior del compartimento lisosómico o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas de forma preferente en tejido tumoral, tales como catepsinas (p. ej., catepsinas B, C, D).

15 Para un análisis con más detalle de tipos de citotoxinas, enlazadores y procedimientos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véanse también Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

20 También se pueden conjugar anticuerpos de la presente invención con un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso terapéutico o de diagnóstico, incluyen, entre otros, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutecio<sup>177</sup>. Los procedimientos para preparar radioinmunoconjugados están establecidos en la técnica. Existen ejemplos de radioinmunoconjugados comercialmente disponibles, que incluyen Zevalin<sup>®</sup> (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar<sup>®</sup> (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar procedimientos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

25 Los conjugados de anticuerpo de la divulgación se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada y el resto de fármaco no debe considerarse limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmentos activos de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón-γ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

35 Se conocen bien técnicas para conjugar estos restos terapéuticos a anticuerpos, véanse, p. ej., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (ed.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (ed.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (ed.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (ed.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, *Immunol Rev.*, 62:119-58 (1982).

### Moléculas biespecíficas

45 En otro aspecto, la presente divulgación muestra moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-SDF-1, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede derivatizar o enlazar con otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína (p. ej., otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas objetivo diferentes. De hecho, el anticuerpo de la invención se puede derivatizar o enlazar a más de una molécula funcional distinta para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas objetivos diferentes; también se pretende que tales moléculas multiespecíficas se engloben en el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la divulgación, se puede enlazar de forma funcional un anticuerpo de la invención (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión distintas, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, mimético peptídico o de unión, de forma que se forma una molécula biespecífica.

55 En consecuencia, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por SDF-1 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítopo objetivo. En una realización en particular, el segundo epítopo objetivo es un receptor de Fc, p.ej., FcγRI humano (CD64) o un receptor

de Fc $\alpha$  humano (CD89). Por lo tanto, la divulgación incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc $\gamma$ R o Fc $\alpha$ R (p. ej., monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células objetivo que expresan SDF-1. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan SDF-1 a células efectoras y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por receptores de Fc, tales como la fagocitosis de células que expresan SDF-1, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

En una realización de la divulgación en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-SDF-1. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción anti-factor de potenciación (EF), p. ej., una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y, de este modo, aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula objetivo. La "porción anti-factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, un fragmento funcional de anticuerpo o un ligando que se une a una molécula dada, p. ej., un antígeno o un receptor, y da lugar de este modo a una potenciación del efecto de los determinantes de unión al receptor de Fc o al antígeno de la célula objetivo. La "porción anti-factor de potenciación" se puede unir a un receptor de Fc o a un antígeno de la célula objetivo. De forma alternativa, la porción anti-factor de potenciación se puede unir a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y la segunda especificidad. Por ejemplo, la porción anti-factor de potenciación se puede unir a una célula T citotóxica (p. ej., a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que dé lugar a un aumento de la respuesta inmunitaria contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluidos, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de la cadena ligera o pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción monocateneria como se describe en la patente de EE. UU. N.º 4.946.778 de Ladner *et al.*

En una realización, la especificidad de unión por un receptor de Fc $\gamma$  la proporciona un anticuerpo monoclonal, cuya unión no se bloquea por inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en el presente documento, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y situados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas transmembranarias o solubles de receptores que se agrupan en tres clases de receptores de Fc $\gamma$ : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fc $\gamma$  es un Fc $\gamma$ RI humano de alta afinidad. El Fc $\gamma$ RI humano es una molécula de 72 kDa que presenta alta afinidad por IgG monomérica (10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>).

La producción y caracterización de determinados anticuerpos monoclonales anti-Fc $\gamma$  preferidos se describen en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de EE. UU. N.º 4.954.617 de Fanger *et al.* Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII o Fc $\gamma$ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fc $\gamma$  del receptor y, por tanto, su unión no se bloquea sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Son anticuerpos específicos anti-Fc $\gamma$ RI útiles en la presente divulgación el Acm 22, el Acm 32, el Acm 44, el Acm 62 y el Acm 197. El hibridoma productor de Acm 32 está disponible de la American Type Culture Collection, n.º de acceso de la ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de Fc $\gamma$  es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describen en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y en la publicación PCT WO 94/10332 de Tempest *et al.* La línea celular productora de anticuerpo H22 se depositó en la American Type Culture Collection bajo la denominación HA022CL1 y tiene el número de acceso n.º CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas adicionales, la especificidad de unión por un receptor de Fc la proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, p. ej., un receptor de Fc-alfa (Fc $\alpha$ RI (CD89)), cuya unión, preferentemente, no se bloquea por inmunoglobulina A (IgA) humana. Se pretende que el término "receptor de IgA" incluya el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembranarias de ajuste alternativo de 55 a 110 kDa. El Fc $\alpha$ RI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos y en granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. El Fc $\alpha$ RI presenta una afinidad media ( $\approx 5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>) tanto por IgA1 como por IgA2, que aumenta tras la exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión a ligando de IgA (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc $\alpha$ RI y Fc $\gamma$ RI son los receptores activadores preferidos para su uso en las moléculas biespecíficas de la divulgación porque (1) se expresan principalmente en células inmunitarias efectoras, p. ej., monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles altos (p. ej., 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (p.ej., CCDA, fagocitosis); y (4) median la presentación de antígenos potenciada de antígenos, incluidos autoantígenos, dirigidos a ellos.

Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos murinos, quiméricos y monoclonales humanos.

Las moléculas biespecíficas de la presente divulgación se pueden preparar conjugando las especificidades de unión que las componen, p. ej., las especificidades de unión anti-FcR y anti-SDF-1, usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede generar por separado cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y después conyugarlas entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se pueden usar una  
 5 variedad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véanse, p. ej., Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* **160**:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8648). Otros procedimientos incluyen los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N.º 78,118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* **229**:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

10 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conyugar por medio de enlace sulfhidrilo de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, se modifica la región bisagra para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

De forma alternativa, se pueden codificar ambas especificidades de unión en el mismo vector y expresarlas y ensamblarlas en la misma célula huésped. Este procedimiento es especialmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión de Acm x Acm, Acm x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la  
 20 invención puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Procedimientos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. número 5.260.203, 5.455.030, 4.881.175, 5.132.405, 5.091.513, 5.476.786, 5.013.653, 5.258.498 y 5.482.858.

25 La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (p. ej., inhibición del crecimiento) o ensayo Western blot. En general, cada uno de estos ensayos detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de especial interés empleando un reactivo marcado (p. ej., un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo se pueden detectar usando, p.  
 30 ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. De forma alternativa, se pueden detectar los complejos usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, marzo de 1986. El isótopo radioactivo se puede  
 35 detectar por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

### Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición p. ej., una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden  
 40 incluir uno o una combinación (p. ej., dos o más diferentes) de anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficas) que se unen a diferentes epítomos del antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en tratamiento combinado, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, el tratamiento combinado puede incluir un anticuerpo anti-SDF-1 de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. A continuación, en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención, se describen con más detalle ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en tratamiento combinado.

50 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., mediante inyección o infusión). En función de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede estar recubierto de un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y  
 55 otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, p. ej., Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**:1-19). Ejemplos de este tipo de sales son las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Las sales

de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenilsustituídos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable la inclusión de agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencionales sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar compuestos activos complementarios.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, una microemulsión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para concentraciones de fármaco elevadas. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según convenga, seguido de microfiltración esterilizante. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo más un ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente filtrada de forma estéril.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará en función del sujeto que se va a tratar y del modo de administración en particular. En general, la cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del cien por cien, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento hasta aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento hasta aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta

terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede disminuir o aumentar la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para su facilidad de administración y la uniformidad de la dosificación. Como se usa en el presente documento, forma unitaria de dosificación, se refiere a unidades físicamente independientes adaptadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención vienen dadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico en particular que se quiere conseguir y (b) de las limitaciones inherentes en la técnica de formar un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y, más habitualmente, de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses o una vez cada de tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-SDF-1 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, siendo administrado el anticuerpo usando una de las siguientes pautas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. Habitualmente, el anticuerpo se administra en varias ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique mediante la medida de niveles en sangre de anticuerpo frente al antígeno objetivo en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos procedimientos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

De forma alternativa, se puede administrar el anticuerpo como una formulación de liberación mantenida, en cuyo caso se necesita una administración mucho menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían en función de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos presentan la semivida más prolongada, seguidos por los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces es necesaria una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que disminuye o cesa la progresión de la enfermedad y, preferentemente, hasta que el paciente presenta una mejora parcial o total de los síntomas de la enfermedad. Después de esto, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos de las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración en particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluidos la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o los ésteres, sales o amidas de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general y antecedentes médicos del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Preferentemente, una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-SDF-1 de la invención da lugar a una disminución de la gravedad de los síntomas patológicos, un aumento de la frecuencia y la duración de los periodos sin síntomas patológicos o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores SDF-1<sup>+</sup>, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente el 80 %, con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema de modelo animal que prediga la eficacia en tumores humanos. De forma alternativa, se puede evaluar esta propiedad de una composición examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, se puede medir dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el facultativo experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico pueden reducir el tamaño del tumor o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica podría determinar dichas cantidades basándose en factores tales como la talla del

sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición en particular o la vía de administración seleccionadas.

Una composición de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán en función de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para anticuerpos de la invención incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Como se usa en el presente documento, la expresión "administración parenteral" significa modos de administración distintos de la administración enteral o tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

De forma alternativa, se puede administrar un anticuerpo de la invención a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán al compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de formulaciones de este tipo están patentados o son conocidos de forma general por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las patentes de EE. UU. N.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de EE. UU. N.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. N.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE. UU. N.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicación a una velocidad de infusión concreta; la patente de EE. UU. N.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE. UU. N.º 4.439.196, que divulga un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimentos con varias cámaras; y la patente de EE. UU. N.º, que divulga un sistema de administración de fármacos osmótico. Los expertos en la técnica conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo.

En determinadas realizaciones, se pueden formular los anticuerpos monoclonales humanos de la invención para garantizar una distribución correcta *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesan la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. 4.522.811, 5.374.548 y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potenciando así la administración de fármacos dirigida (véase, p. ej., V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los ejemplos de restos que se dirigen a objetivos incluyen folato o biotina (véase, p. ej., la patente de EE. UU. 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); el receptor de proteína A tensioactiva (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); pág. 120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinanen; MX. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

### Usos y procedimientos

Los anticuerpos, en particular los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y procedimientos de la presente divulgación tienen numerosas utilidades de diagnóstico y tratamiento *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y el tratamiento de trastornos mediados por SDF-1. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, p. ej., *in vivo*, para tratar, evitar y diagnosticar una variedad de trastornos. Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "sujeto" incluya seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos con trastornos mediados por la actividad de SDF-1. Los procedimientos son especialmente adecuados para tratar a pacientes humanos que tiene un trastorno asociado con la expresión aberrante de SDF-1. Cuando se administran anticuerpos frente a SDF-1 junto con otro agente, se pueden administrar los dos en cualquier orden o simultáneamente.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la invención por SDF-1, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar específicamente la expresión de SDF-1 en la superficie de células y, además, se pueden usar para purificar SDF-1 mediante purificación por inmovinoafinidad.

5 La metástasis de cáncer de mama se produce con un patrón distinto que implica a los ganglios linfáticos regionales, la médula ósea, los pulmones y el hígado. Se descubrió que el CXCR4 se expresa altamente en células de cáncer de mama primario y metastásico pero no es detectable en tejido mamario normal (Mullet *et al.* (2001) *Nature* 410:50-6). También se ha sugerido que el SDF-1 desempeña un papel en la metástasis de cáncer de pulmón no microcítico, donde las células cancerosas sufren quimiotaxis en respuesta al SDF-1 (Phillips *et al.* (2003) *Am J Respir Crit Care Med* 167:1676-86). Se ha sugerido que el SDF-1 induce niveles altos de polimerización de F-actina y formación de pseudópodos en extractos celulares de cáncer de mama, pulmón e hígado, que dan lugar a la migración dirección de células de cáncer de mama *in vitro*. Se ha demostrado anteriormente que esta migración de células de cáncer de mama se bloquea por anticuerpos frente a CXCR4 o CCL21. También se ha demostrado que el SDF-1 desempeña un papel en el colangiocarcinoma intrahepático (CCI) (Ohira *et al.* (2006) *Am J Pathol* 168:1155-68). Además, se ha descubierto que la inhibición de la interacción del SDF-1 con el CXCR4 está implicada en la movilización de células madre y puede ser un tratamiento útil para otros cánceres diversos, por ejemplo, mieloma múltiple y linfoma no hodgkiniano (Fricker *et al.* (2006) publicado antes de la edición impresa; Fruehauf y Seeger (2005) *Future Oncol* 1:375-83).

20 Preferentemente, los cánceres cuyo crecimiento se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención incluyen tumores metastásicos y cánceres que normalmente responden al inmunotratamiento. Los ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para su tratamiento incluyen cáncer de mama, mieloma múltiple y linfomas (p. ej., linfoma hodgkiniano y no hodgkiniano, linfoma linfocítico, linfoma primario SNC, linfoma de células T). Los ejemplos de otros cánceres que se pueden tratar usando los procedimientos de la invención incluyen melanoma (p. ej., melanoma maligno metastásico), cáncer renal (p. ej., carcinoma de células renales), tumores cerebrales, leucemias crónicas o agudas, incluidas leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, y carcinomas nasofaríngeos, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer del recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de útero, cáncer de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blandos, cáncer de la uretra, cáncer de pene, tumores sólidos infantiles, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), angiogénesis tumoral, tumores del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por amianto, p. ej., mesotelioma, y combinaciones de dichos cánceres.

40 Además, los anticuerpos humanos y las composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan SDF-1, incluidos, por ejemplo, cáncer de mama, mieloma múltiple, linfoma no hodgkiniano (LNH), carcinomas de células renales (CCR), tales como CCR de células claras, glioblastoma, cáncer de mama, tumores cerebrales, carcinomas nasofaríngeos, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (LACG), linfomas cutáneos de células T, linfomas de células pequeñas hendidas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (LLT), leucemia de células T del adulto (LLT-A), cánceres linfomas foliculares centrolásticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (LAAI), linfomas basados en cavidades corporales asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas rinofaríngeos no diferenciados (p. ej., tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de células B.

50 En consecuencia, en una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-SDF-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-SDF-1 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-SDF-1 humano descritos en el presente documento). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-SDF-1 quimérico o humanizado.

55 También se ha detectado SDF-1 en el recubrimiento hiperplásico y en la matriz extracelular y el recubrimiento perivascular, incluido el endotelio de los vasos sanguíneos, de secciones sinoviales de artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA) (Pablos *et al.* (2003) *J Immunol* 170:2147-52). Los análisis por Northern blot de sinoviocitos de tipo fibroblasto de OA y AR detectaron expresión de SDF-1 que no estaba inducida por citocinas proinflamatorias, factores angiogénicos o hipoxia. La eliminación de moléculas de heparán sulfato de células endoteliales eliminó la inmunotinción de SDF-1 de estas células, lo que indica que el SDF-1 se acumula en la superficie de células endoteliales. Se sugirió que el aumento de la producción de SDF-1 en sinovio de AR da lugar a su acumulación en factores sensibles a heparinasa de las células endoteliales, y que el SDF-1 participa en la angiogénesis asociada

con la inflamación crónica. Se ha demostrado que el SDF-1 induce la neovascularización de la mucosa bronquial en sujetos asmáticos y que el bloqueo del CXCR4, el receptor del SDF-1, atenúa la inflamación alérgica de los pulmones, la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, la hiperreactividad de las vías respiratorias y la formación de granuloma pulmonar de tipo hipersensibilidad (Hoshino *et al.* (2003) *Eur Respir J* 21:804-9; Lukacs *et al.* (2002) *Am J Pathol* 160:1353-60; Gonzalo *et al.* (2000) *J Immunol* 165:499-508; Hu *et al.* (2006) *Am J Pathol* 169:424-32).

Como tal, los anticuerpos humanos y composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con un trastorno autoinmunitario, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de SDF-1, incluidos, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), osteoartritis (OA), encefalomiелitis experimental autoinmunitaria, asma, inflamación alérgica, tal como inflamación alérgica pulmonar, enfermedad alérgica de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias y granuloma pulmonar de tipo hipersensibilidad. Los trastornos autoinmunitarios adicionales en los que se pueden usar los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (incluidas la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la enfermedad celiaca), esclerosis múltiple (EM), psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria y glomerulonefritis. Además, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para tratar el rechazo de trasplantes.

En consecuencia, en una realización, la invención es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto con un trastorno autoinmunitario que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-SDF-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-SDF-1 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-SDF-1 humano descritos en el presente documento). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-SDF-1 quimérico o humanizado.

En pacientes con retinopatía diabética proliferativa, se demostró que las concentraciones de SDF-1 aumentaban significativamente en el vítreo y se correspondían con la gravedad de la enfermedad (Butler *et al.* (2005) *J Clin Invest* 115:86-93). El tratamiento de pacientes con triamcinolona redujo los niveles de SDF-1 en el vítreo con una notable mejora de la enfermedad, una disminución de los niveles de SDF-1 y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), eliminó el edema macular difuso y provocó la regresión de la neovascularización activa (Brooks *et al.* (2004) *Arch Ophthalmol* 122:1801 -7). En un modelo de ratón de retinopatía diabética proliferativa, los niveles de SDF-1 coincidentes con los de los pacientes indujeron retinopatía en los ratones, y la inyección intravítrea de bloqueo de anticuerpos frente a SDF-1 evitó la neovascularización retiniana. Se ha observado expresión tanto de SDF-1 como de CXCR-4 en ojos con degeneración macular senil (Bhutto *et al.* (2006) *Br J Ophthalmol* 90:906-10).

En consecuencia, en una realización, la invención es para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto con retinopatía diabética proliferativa, edema macular quistoide o degeneración macular senil que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-SDF-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-SDF-1 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-SDF-1 humano descritos en el presente documento). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-SDF-1 quimérico o humanizado.

Se ha demostrado que mezclas en circulación de fibrocitos CD45+, colágeno I+, CXCR4+ se desplazan a zonas de fibrosis, incluida fibrosis pulmonar. Se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-SDF-1 inhibe el reclutamiento intrapulmonar de fibrocitos CD45+, colágeno I+, CXCR4+ y atenúa la fibrosis pulmonar (Phillips *et al.* (2004) *J Clin Invest* 114:438-46).

En consecuencia, en una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto con fibrosis que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-SDF-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-SDF-1 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-SDF-1 humano descritos en el presente documento). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-SDF-1 quimérico o humanizado.

También se ha demostrado que la unión de SDF-1 a CXCR4 desempeña un papel en acontecimientos isquémicos, incluidas la angiogénesis inducida por isquemia y la contracción de microvasos coronarios (Mieno *et al.* (2006) *Ann Thorac Surg* 82:657-63). En consecuencia, en una realización, la divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto con isquemia, angiogénesis inducida por isquemia o contracción de microvasos coronarios, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-SDF-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-SDF-1 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-SDF-1 humano descritos en el presente documento). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-SDF-1 quimérico o humanizado.

En una realización, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos) de la invención se pueden usar para detectar niveles de SDF-1 o niveles de células que contienen SDF-1 en su superficie de membrana, niveles que se pueden relacionar después con síntomas de enfermedades determinadas. De forma alternativa, los anticuerpos se pueden usar para inhibir o bloquear la función de SDF-1, que a su vez se puede relacionar con la prevención o la mejora de síntomas de enfermedades determinadas, implicando de este modo a SDF-1 como mediador de la enfermedad. Esto se puede conseguir poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo

anti-SDF-1 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y el SDF-1. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y el SDF-1 se detecta y se compara en la muestra y el control.

En otra realización, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos y composiciones) de la invención se pueden probar inicialmente para evaluar la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, se pueden probar las composiciones de la invención usando los ensayos de citometría de flujo descritos en los ejemplos que figuran a continuación.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos y composiciones) de la invención presentan una utilidad adicional en el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con SDF-1. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunocombinados se pueden usar para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: para inhibir el crecimiento de y/o destruir una célula que expresa SDF-1; para mediar la fagocitosis o la CCDA de una célula que expresa SDF-1 en presencia de células efectoras humanas o para bloquear la unión del ligando de SDF-1 a SDF-1.

En una realización en particular, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos y composiciones) se usan *in vivo* para tratar, evitar o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con SDF-1. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con SDF-1 incluyen, entre otras, cáncer de mama, artritis reumatoide, osteoartritis, retinopatía diabética proliferativa, trastornos autoinmunitarios, cáncer, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de Burkitt, linfomas anaplásicos de células grandes (LACG), mieloma múltiple, linfomas cutáneos de células T, linfomas de células pequeñas hendidas nodulares, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfoma de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfoma de células T (LLT), leucemia de células T del adulto (LLT-A), cánceres linfomas foliculares centroblasticos/centrocíticos (cb/cc), linfomas difusos de células grandes de linaje B, linfoma de células T de tipo linfadenopatía angioinmunoblástica (LAAI), linfomas basados en cavidades corporales asociados con VIH, carcinomas embrionarios, carcinomas rinofaríngeos no diferenciados (p. ej., tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de células B.

En la técnica se conocen bien las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos) de la invención *in vivo* e *in vitro* y los expertos en la técnica las pueden seleccionar. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección (p. ej., intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o la formulación de la composición de anticuerpos.

Como se describe anteriormente, los anticuerpos humanos anti-SDF-1 de la invención se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos, p. ej., un agente citotóxico, un agente radioactivo o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede enlazar al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración por separado), el anticuerpo se puede administrar antes, después o simultáneamente con el agente o se puede coadministrar con otros tratamientos conocidos, p. ej., un tratamiento anticancer, p. ej., radiación. Los agentes terapéuticos de este tipo incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida hidroxilada que, por sí mismos, sólo son eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos humanos anti-SDF-1, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterápicos proporciona dos agentes anticancer que funcionan por medio de diferentes mecanismos que proporcionan un efecto citotóxico frente a células tumorales humanas. Esta coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio de la antigenicidad de las células tumorales que haría que no fueran reactivas al anticuerpo.

También se pueden usar como agentes terapéuticos células efectoras específicas de objetivo, p. ej., células efectoras enlazadas a composiciones (p. ej., anticuerpos humanos y moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención. Las células efectoras dirigidas pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales y otras células portadoras de receptores de IgG e IgA. Si se desea, se pueden obtener células efectoras del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras específicas de objetivo se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de  $10^8$ - $10^9$  pero variará en función del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener una localización en la célula objetivo, p. ej., una célula tumoral que expresa SDF-1, y efectuar la destrucción de la célula mediante, p. ej., fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

El tratamiento con células efectoras específicas de objetivo se puede realizar junto con otras técnicas para la eliminación de las células objetivo. Por ejemplo, se puede usar un tratamiento antitumoral usando las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos y moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o células efectoras unidas a estas composiciones junto con quimioterapia. Adicionalmente, se puede usar inmunotratamiento combinado para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos anti-SDF-1 enlazados a anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 junto con agentes de unión

específicos para receptores de IgG o IgA.

También se pueden usar moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación para modular FcγR o los niveles de FcγR en células efectoras, tal como tapando y eliminando receptores de la superficie celular. También se pueden usar mezclas de receptores anti-Fc con este propósito.

5 Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados y o quiméricos) de la invención que presentan sitios de unión del complemento, tales como porciones de IgG1, 2 o 3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden usar en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células objetivo con un agente de unión de la divulgación y células efectoras apropiadas se puede complementar mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de células objetivo recubiertas con un agente de unión de la divulgación se puede mejorar mediante la unión de proteínas del complemento. En otra realización, también se pueden lisar células objetivo recubiertas con las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos) de la invención mediante el complemento. En otra realización más, las composiciones de la invención no activan el complemento.

15 Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados y quiméricos) de la invención también se pueden administrar junto con el complemento. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento se sitúa muy próximo a los anticuerpos humanos o las moléculas multiespecíficas o biespecíficas. De forma alternativa, los anticuerpos humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la divulgación y el complemento o el suero se pueden administrar por separado.

También se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la divulgación (p. ej., anticuerpos humanos y moléculas multiespecíficas y biespecíficas o inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos de la invención adicionales (p. ej., un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo del antígeno de SDF-1 distinto del primer anticuerpo humano).

25 En consecuencia, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención se les puede administrar adicionalmente (antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

30 En otras realizaciones, se puede tratar al sujeto adicionalmente con un agente que modula, p. ej., potencia o inhibe, la expresión o actividad de Fcγ o receptores de Fcγ, por ejemplo, tratando al sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas para su administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos (GM-CSF), el interferón γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

35 Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos) de la invención también se pueden usar para dirigirse a células objetivo que expresan FcγR o SDF-1, por ejemplo, para marcar células de este tipo. Para este uso, se puede enlazar el agente de unión a una molécula que se puede detectar. Por tanto, la divulgación proporciona procedimientos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan receptores de Fc, tales como FcγR o SDF-1. La marca detectable puede ser, p. ej., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

40 En una realización en particular, la divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia del antígeno SDF-1 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno SDF-1, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a SDF-1 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción del mismo y SDF-1. Después, se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia de formación de complejo entre la muestra comparada y la muestra de control indica la presencia de antígeno SDF-1 en la muestra.

45 En otra realización más, se pueden usar inmunoconjugados de la divulgación para dirigir compuestos (p. ej., agentes terapéuticos, marcas, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular de SDF-1 enlazando tales compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo anti-SDF-1 con cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes de EE. UU. N.º 6.281.354 y 6.548.530, las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 20030050331, 20030064984, 20030073852 y 20040087497, o publicados en el documento WO 03/022806. Por tanto, la divulgación también proporciona procedimientos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan SDF-1 (p. ej., con una marca detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). De forma alternativa, los inmunoconjugados se pueden usar para destruir células que tienen receptores de superficie celular de SDF-1 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a SDF-1.

55 La presente invención se ilustra con más detalle mediante los ejemplos siguientes, que no se deben interpretar como

una limitación adicional.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1

5 Se produjeron anticuerpos usando la tecnología Trans-Phage<sup>SM</sup>, que combina el sistema UltiMab Human Antibody Development System<sup>®</sup>, que genera anticuerpos totalmente humanos en un sistema de ratón transgénico estable, y la tecnología de presentación en fagos Omniclonal<sup>®</sup>, que genera colecciones de anticuerpos a medida, y permite la selección a partir de una colección combinatoria de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo.

#### HuMab Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup> transgénicos

10 Se prepararon anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a SDF-1 usando la cepa HCo7 del HuMab Mouse<sup>®</sup> transgénico y la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, cada una de las cuales expresa genes de anticuerpo humano. En cada una de estas cepas de ratón, se había interrumpido de forma homocigótica el gen de la cadena ligera kappa de ratón endógeno como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.*12:811-820 y se había interrumpido de forma homocigótica el gen endógeno de la cadena pesada de ratón como se describe en el ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón es portadora de un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las patentes de EE. UU. N.º 5.545.806, 5.625.825 y 5.545.807. La cepa KM Mouse<sup>®</sup> contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación PCT WO 02/43478.

#### Inmunizaciones de HuMab y KM:

20 Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a SDF-1, se inmunizaron ratones HuMab Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup> con SDF-1 $\alpha$  recombinante purificado (Peptrotech; Rocky Hill, NJ). Las isoformas humanas SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$  y SDF-1 $\gamma$  se pueden usar indistintamente, dado que los dominios extracelulares son idénticos. Los esquemas de inmunización general para el HuMab Mouse<sup>®</sup> se describen en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y en la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (5-50  $\mu$ g) de SDF-1 $\alpha$  para inmunizar cada HuMab Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup>.

30 Los ratones transgénicos se inmunizaron dos veces con antígeno en adyuvante completo de Freund o adyuvante Ribi por vía intraperitoneal (IP), subcutánea (Sc) o a través de la almohadilla plantar (AP), seguido de 3-21 días de inmunización IP, Sc o AP (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o adyuvante Ribi. Se realizó un seguimiento de la respuesta inmunitaria mediante sangrados retroorbitales. Se rastreó el plasma mediante ELISA (como se describe a continuación) y los ratones con títulos de inmunoglobulina humana anti-SDF-1 suficientemente altos se usaron para fusiones. A los ratones se les administró refuerzo por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes de sacrificarlos y retirarles el bazo.

#### Selección de un HuMab Mouse<sup>®</sup> o un KM Mouse<sup>®</sup> productor de anticuerpos anti-SDF-1:

35 Para seleccionar un HuMab Mouse<sup>®</sup> o un KM Mouse<sup>®</sup> productor de anticuerpos que se unen a SDF-1, se probaron sueros de ratones inmunizados mediante ELISA como se describe por Fishwild, D. *et al.* (1996) (*supra*). Brevemente, se recubrieron placas con SDF-1 recombinante purificado a 1-2  $\mu$ g/ml en PBS, se incubaron 50  $\mu$ l/pocillo a 4 °C durante la noche y después se bloquearon con 200  $\mu$ l/pocillo de suero de pollo al 5 % en PBS/Tween (al 0,05 %). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con SDF-1 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo Fc policlonal de cabra anti- IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavarlas, las placas se revelaron con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron mediante un espectrofotómetro a una DO de 415-495. Los ratones que desarrollaron las titulaciones más altas de anticuerpos anti-SDF-1 se usaron para generar anticuerpos.

#### 45 Generación de colecciones combinatorias de presentación en fagos y rastreo

50 Se construyeron colecciones de ADNc iniciales de regiones variables de anticuerpos con los bazos de HuMab mouse<sup>®</sup> o KM mouse<sup>®</sup> inmunizados con SDF-1. Después, se clonaron las regiones variables de anticuerpo en vectores de expresión en fago. Se realizó la selección en fagos usando el procedimiento de selección en fagos Omniclonal<sup>®</sup> (Biosite Inc, San Diego, CA) con SDF-1 biotinilado para rastrear fragmentos de la región variable con afinidad nanomolar (bazo de KM) o afinidad subnanomolar (bazo de HuMab). Los fragmentos de la región variable de interés se vuelven a clonar en un vector de expresión de Fab y se vuelve a probar el Fab para evaluar la afinidad de unión y la afinidad funcional. La porción N-terminal de la región variable, que se codificó con un cebador, se retomó a la secuencia de línea germinal para cada región variable. Después, se generaron anticuerpos completos a partir de los Fab anti-SDF-1 de alta afinidad usando técnicas estándar de biología molecular.

#### 55 Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos frente a SDF-1:

Como procedimiento alternativo, los esplenocitos de ratón, aislados a partir de un HuMab Mouse<sup>®</sup> y/o un KM Mouse<sup>®</sup>, se fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón, bien usando PEG basándose en protocolos estándar o bien electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión celular de cámara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Después, los hibridomas resultantes se rastrean para producir anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionan suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50 % (Sigma). Se plaquean las células a aproximadamente  $1 \times 10^5$ /pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene suero bovino fetal al 10 %, medio condicionado P388D1 al 10 % (ATCC, CRL TIB-63), origen (IGEN) al 3-5 % en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con glucosa alta, L-glutamina y piruvato de sodio) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1x (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, se cultivan las células en medio en el que se reemplaza el HAT con HT. Después, se rastrean los pocillos individuales mediante ELISA (descrito anteriormente) para detectar anticuerpos IgG humanos monoclonales anti-SDF-1. Una vez se produce el crecimiento extenso del hibridoma, se realiza un seguimiento del medio habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se vuelven a plaquear, se rastrean de nuevo y, si siguen siendo positivos para IgG humana, se subclonan anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 al menos dos veces mediante dilución limitante. Después, se cultivan los subclones estables *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización adicional.

Los clones de hibridoma 1D3 y 1H2, generados a partir de un KM Mouse<sup>®</sup>, y 1C6 y 2A5, generados a partir de un HuMab Mouse<sup>®</sup>, se seleccionaron para su análisis adicional.

### **Ejemplo 2: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5**

Se obtuvieron las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5 a partir de los hibridomas 1D3, 1H2, 1C6 y 2A5, respectivamente, usando técnicas de PCR estándar y se secuenciaron usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1D3 se muestran en la figura 1A y en las SEQ ID NO: 33 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1D3 se muestran en la figura 1B y en las SEQ ID NO: 37 y 5, respectivamente.

La comparación de la secuencia la cadena pesada de inmunoglobulina 1D3 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 1D3 utiliza un segmento V<sub>H</sub> de V<sub>H</sub> 1-24 de la línea germinal humana, un segmento D de 6-19 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 6b de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia V<sub>H</sub> de 1D3 con la secuencia V<sub>H</sub> 1-24 de línea germinal se muestra en la figura 5. El análisis adicional de la secuencia V<sub>H</sub> de 1D3 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en las figuras 1A y 5 y en las SEQ ID NO: 9, 13 y 17, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 1D3 con las secuencias de la cadena ligera de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 1D3 utiliza un segmento V<sub>L</sub> de V<sub>K</sub> L18 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK 4 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia V<sub>L</sub> de 1D3 con la secuencia V<sub>K</sub> L18 de la línea germinal se muestra en la figura 7. El análisis adicional de la secuencia V<sub>L</sub> de 1D3 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la la cadena ligera como se muestra en las figuras 1B y 7 y en las SEQ ID NO: 21, 25 y 29, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1H2 se muestran en la figura 2A y en las SEQ ID NO: 34 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1H2 se muestran en la figura 2B y en las SEQ ID NO: 38 y 6, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 1H2 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 1H2 utiliza un segmento V<sub>H</sub> de V<sub>H</sub> 1-24 de línea germinal humana, un segmento D de 6-19 de la línea germinal humana y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia V<sub>H</sub> de 1H2 con la secuencia V<sub>H</sub> 1-24 de línea germinal se muestra en la figura 5. El análisis adicional de la secuencia V<sub>H</sub> de 1H2 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada como se muestra en las figuras 2A y 5 y en las SEQ ID NO: 10, 14 y 18, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 1H2 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 1H2 utiliza un segmento V<sub>L</sub> de V<sub>K</sub> L18 de la línea germinal humana y un segmento JK de JK 4 de la línea germinal humana. La alineación de la secuencia V<sub>L</sub> de 1H2 con la secuencia V<sub>K</sub> L18 de línea germinal se muestra en la figura 7. El análisis

adicional de la secuencia  $V_L$  de 1H2 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en las figuras 2B y 7 y en las SEQ ID NO: 22, 26 y 30, respectivamente.

5 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1C6 se muestran en la figura 3A y en las SEQ ID NO: 35 y 3, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1C6 se muestran en la figura 3B y en las SEQ ID NO: 39 y 7, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 1C6 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la la cadena pesada de 1C6 utiliza un segmento  $V_H$  de  $V_H$  3-7 de línea germinal humana, un segmento D de 7-27 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia  $V_H$  de 1C6 con la secuencia  $V_H$  3-7 de línea germinal se muestra en la figura 6. El análisis adicional de la secuencia  $V_H$  de 1C6 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la la cadena pesada como se muestra en las figuras 3A y 6 y en las SEQ ID NO: 11, 15 y 19, respectivamente.

15 La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina 1C6 con las secuencias de la cadena ligera de la línea germinal humana conocidas demostró que la la cadena ligera de 1C6 utiliza un segmento  $V_L$  de  $V_K$  L18 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de línea germinal humana. La alineación de la secuencia  $V_L$  de 1C6 con la secuencia  $V_K$  L18 de línea germinal se muestra en la figura 8. El análisis adicional de la secuencia  $V_L$  de 1C6 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera como se muestra en las figuras 3B y 8 y en las SEQ ID NO: 23, 27 y 31, respectivamente.

20 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2A5 se muestran en la figura 4A y en las SEQ ID NO: 36 y 4, respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2A5 se muestran en la figura 4B y en las SEQ ID NO: 40 y 8, respectivamente.

30 La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina 2A5 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la la cadena pesada de 2A5 utiliza un segmento  $V_H$  de  $V_H$  3-7 de línea germinal humana, un segmento D de 7-27 de línea germinal humana y un segmento JH de JH 6b de línea germinal humana. La alineación de la secuencia  $V_H$  de 2A5 con la secuencia  $V_H$  3-7 de línea germinal se muestra en la figura 6. El análisis adicional de la secuencia  $V_H$  de 2A5 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la la cadena pesada como se muestra en las figuras 4A y 6 y en las SEQ ID NO: 12, 16 y 20, respectivamente.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 2A5 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas demostró que la la cadena ligera de 2A5 utiliza un segmento  $V_L$  de  $V_K$  L18 de línea germinal humana y un segmento JK de JK 1 de la línea germinal humana.

La alineación de la secuencia  $V_L$  de 2A5 con la secuencias  $V_K$  L18 de línea germinal se muestra en la figura 8. El análisis adicional de la secuencia  $V_L$  de 2A5 usando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR dio lugar a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la la cadena ligera como se muestra en las figuras 4B y 8 y en las SEQ ID NO: 24, 28 y 32, respectivamente.

#### 40 **Ejemplo 3: Caracterización de la especificidad de unión y la cinética de unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-SDF-1**

En este ejemplo, se estudiaron la afinidad de unión y la cinética de unión de anticuerpos anti-SDF-1 mediante análisis Biacore y análisis de inmunotransferencia de bandas western.

##### **Afinidad y cinética de unión**

45 Se caracterizaron anticuerpos anti-SDF-1 por su afinidad y cinética de unión mediante análisis Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se enlazaron covalentemente anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 purificados a un chip CM5 (chip recubierto con carboximetildextrano) por medio de aminas primarias, usando química de acoplamiento de aminas estándar y un kit suministrado por Biacore. Se midió la unión haciendo fluir el SDF-1 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) en tampón PBS (pH 7,4) a concentraciones de 40, 30, 20, 10 y 5 nM a un caudal de 75  $\mu$ l/min. El SDF-1 se inyectó inmediatamente después de su dilución para aumentar al máximo la población de dímeros. La cinética de asociación de antígeno-anticuerpo se siguió durante 2 minutos y la cinética de disociación se siguió durante 8 minutos. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión 1:1 de Langmuir usando el programa informático BIAevaluation (Biacore AB). Los valores de  $K_D$ ,  $k_a$  y  $k_d$  que se determinaron se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de unión Biacore para Acm Hu frente a SDF-1.

| Anticuerpo anti-SDF-1 | Afinidad $K_D \times 10^{-9}(M)$ | Velocidad de asociación $k_a \times 10^5 (1/Ms)$ | Velocidad de disociación $k_d \times 10^{-4} 1/s$ |
|-----------------------|----------------------------------|--|---|
| 1D3                   | 0,63                             | 8,0  | 5,0   |
| 1H2                   | 1,32                             | 6,0  | 8,4   |
| 1C6                   | 0,46                             | 14   | 6,4   |
| 2A5                   | 0,37                             | 29   | 11  |

### Inmunoprecipitación y Western blot para SDF-1

5 Se caracterizaron anticuerpos anti-SDF-1 por su unión a SDF-1 nativo mediante inmunoprecipitación y análisis Western blot.

10 Se realizó una preparación de  $4,5 \times 10^8$  plaquetas y se preparó un matraz T75 de células confluentes al 90-95 % en cada caso de células CHO-SDF, CHO-S y MCF7. Las células se lavaron dos veces con PBS frío. Las células se lisaron en 1,5 ml de tampón de lisis (kit de inmunoprecipitación de Roche, n.º de cat. 1719394) y se rompieron por sonicación en hielo usando cinco ráfagas de 1 segundo. La mezcla se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó usando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (PIERCE, n.º de cat. 23235). Los lisados celulares se preclararon añadiendo 50  $\mu$ l de proteína G agarosa a la mezcla e incubándola a 2-8 °C durante 3 horas. Se añadieron cinco  $\mu$ g del anticuerpo anti-SDF-1 2A5 o de un anticuerpo de control de isotipo a 500  $\mu$ g de plaquetas y uno de los lisados de células CHO-SDF, CHO-S y MCF7 y se incubaron durante 1 hora a 2-8 °C en una plataforma de balanceo. El complejo de anticuerpo-SDF-1 se inmunoprecipitó mediante la adición de 50  $\mu$ l de proteína G agarosa a la mezcla y se incubó durante la noche a 2-8 °C en una plataforma de balanceo. Las perlas se precipitaron por centrifugación a  $12.000 \times g$  durante 1 minuto. Después, se lavaron las perlas 6 veces con tampones de lavado (kit de inmunoprecipitación de Roche, n.º de cat. 1719394). Para el análisis western, se añadieron 60  $\mu$ l de tampón de carga LDS (Invitrogen, n.º de cat. NP0007) a cada muestra y se calentó hasta 100 °C durante 3 minutos para desnaturalizar la proteína. Se usaron técnicas estándar de Western blot y las transferencias se realizaron con 3  $\mu$ g/ml de anticuerpo quimérico de ratón 2A5 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los resultados muestran que el anticuerpo anti-SDF-1 se une a una banda de aproximadamente 8 KDa, correspondiente con el peso molecular del SDF-1.

### Ejemplo 4: Procedimientos Biacore y de espectroscopía de fluorescencia para caracterizar los estados oligoméricos de SDF-1

25 El estado de oligomerización de SDF-1 se determinó mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Ambos conjuntos de experimentos se realizaron con un instrumento Fluorolog 3.2 de Spex (Spex, Edison, NJ).

30 Los experimentos de anisotropía de fluorescencia utilizaron SDF-1 marcado con fluoresceína. El experimento se realizó con excitación a 494 nm y emisión controlada a 514 nm y las rendijas fijadas a un paso de banda de 5 nm. En estos experimentos se diluyó una solución 12,5  $\mu$ M de SDF-1 a 50 nM y se midió la anisotropía en función del tiempo. Estos experimentos se realizaron en PBS y PBS y  $CaCl_2$  1 mM. La anisotropía, que depende de la masa total y la forma del complejo molecular, disminuye en ausencia de  $CaCl_2$ , pero permanece constante con la adición de  $CaCl_2$  1 mM.

35 Los experimentos de FRET usaron SDF-1 marcado con dansilo y SDF-1 marcado con fluoresceína. Estos experimentos se realizaron con excitación a 335 nm y emisión a 520 nm y el paso de banda del espectrómetro se fijó a 5 nm. En estos experimentos se diluyó una solución 12,5  $\mu$ M de SDF-1 a 50 nM y se midió la señal de FRET en función del tiempo. Estos experimentos se realizaron en PBS y PBS +  $CaCl_2$  1 mM. Los resultados se muestran en la figura 9. La figura 9A muestra el efecto del  $CaCl_2$  1 mM sobre la pérdida de dímeros de SDF-1 en función del tiempo tras la dilución, basado en medidas de anisotropía. La figura 9B muestra el efecto del  $CaCl_2$  1 mM sobre la pérdida de dímeros de SDF-1 en función del tiempo tras la dilución, basado en medidas de FRET. Los experimentos de anisotropía de fluorescencia y FRET demuestran la pérdida de dimerización de SDF-1 en función del tiempo tras la dilución en tampón PBS, pero no en tampón PBS complementado con  $CaCl_2$  1 mM.

### Ejemplo 5: Termoestabilidad de anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 mediante calorimetría diferencial de barrido

45 La estabilidad térmica de los anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 se determinó usando análisis calorimétricos de la temperatura de fusión del anticuerpo.

Las medidas calorimétricas de las temperaturas de fusión ( $T_f$ ) se llevaron a cabo en una plataforma de microcalorímetro diferencial de barrido VP-Capillary DSC combinada con un automuestreador (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA). El volumen de la celda de muestra es de 0,144 ml. Se obtuvieron datos de

desnaturalización calentando las muestras, a una concentración de 2,0  $\mu\text{M}$ , desde 30 hasta 95  $^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Las muestras de proteína se encontraban en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4. En la celda de referencia se usó el mismo tampón para obtener la capacidad calorífica molar mediante comparación. Los termogramas observados se corrigieron con el nivel basal y los datos normalizados se analizaron basándose en un modelo que no es de 2 etapas, usando el programa informático Origin v7.0. Los datos se muestran en la tabla 4. El anticuerpo monoclonal anti-SDF-1 2A5 es más estable mediante calorimetría diferencial de barrido en comparación con 1C6, 1H2 y 1D3.

Tabla 4. Datos de calorimetría diferencial de barrido para Acm Hu frente a SDF-1.

| Anticuerpo anti-SDF-1 | T <sub>F1</sub> ( $^{\circ}\text{C}$ ) | T <sub>F2</sub> ( $^{\circ}\text{C}$ ) |
|-----------------------|--|--|
| 1D3                   | 57,8                                   | 65,8                                   |
| 1H2                   | 59,9                                   | 65,7                                   |
| 1C6                   | 59,6                                   | 66,8                                   |
| 2A5                   | 68,6                                   | 75,0                                   |

#### 10 Ejemplo 6: Procedimientos para estabilidad física bajo desnaturalización química

Las estabildades de anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 se compararon midiendo el punto medio de la desnaturalización química mediante espectroscopía de fluorescencia.

Las medidas de fluorescencia de la desnaturalización química se realizaron en un Fluorolog 3.22 de SPEX equipado con un lector de placas Micromax (SPEX, Edison, NJ). Las medidas se realizaron en muestras de anticuerpos que se habían dejado equilibrar durante 24 horas en 16 concentraciones diferentes de clorhidrato de guanidinio en tampón PBS. Las medidas de realizaron en placas de 384 pocillos de superficie que no se une, de bajo volumen, negras (Corning, Acton, MA) y requirieron 1  $\mu\text{M}$  de anticuerpo en un volumen de pocillo de 12  $\mu\text{l}$ . Se excitó la fluorescencia a 280 nm y los espectros de emisión se midieron entre 300 y 400 nm. La velocidad de barrido fue de 1 segundo por nm y las rendijas se fijaron a un paso de banda de 5 nm. Se realizó un blanco de tampón usando PBS y se restó automáticamente de los datos. Los datos se ajustaron a un modelo de desnaturalización de dos estados usando el programa informático Prism de GraphPad. Los datos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: La desnaturalización química de anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 determinada por espectroscopía de fluorescencia

| Clon  | Punto medio de desplegado (M) |
|-------|-------------------------------|
| Z2/A5 | 2,63                          |
| B1/H2 | 1,96                          |
| Z1/C6 | 1,94                          |
| B1/D3 | 1,94                          |

#### 25 Ejemplo 7: Procedimientos de mapeo de epítomos basado en péptidos nativos y sintéticos mediante espectroscopía de masas y Biacore

Existen dos enfoques para la identificación de secuencias por espectrometría de masas de epítomos moleculares en la quimiocina: extracción de epítomos y escisión de epítomos. En la extracción de epítomos, en primer lugar se somete la quimiocina a digestión enzimática, después se mezclan sus fragmentos peptídicos con resina POROS unida a anticuerpo anti-quimiocina para detectar elementos que se unen; mientras que en la escisión de epítomos, la digestión se realiza *in situ* al mismo tiempo que la quimiocina se une al anticuerpo.

##### Procedimiento para estudiar la unión de péptidos sintéticos a Acm mediante espectroscopía de masas

Después de retirar por lavado los elementos que no se unen se tomó conjuntamente el epítomo que contenía péptido(s) que todavía estaba unido sobre la resina de anticuerpo directamente para análisis MALDI-EM, o se eluyó por separado del anticuerpo y se analizó por ESI-EM.

Se generaron varios patrones de fragmentos peptídicos usando diversas proteasas para cubrir la secuencia de quimiocina entera. Con diferentes solapamientos, se estudió la unión a epítomo de los péptidos de quimiocina en forma tanto reducida como nativa. Pueden ser necesarias varias enzimas, combinadas o en serie, para lograr el corte más ajustado cerca de la región de epítomo.

Los péptidos que se han identificado por espectroscopía de masas como elementos de unión al anticuerpo se identificaron en la estructura tridimensional de la quimiocina, determinada por cristalografía de rayos X y que está

disponible y es de dominio público ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Mediante este procedimiento, se pudieron eliminar determinados tramos de aminoácidos identificados por espectroscopía de masas como falsos positivos, por ejemplo, si se encontraban demasiado alejados del núcleo del epítipo para que los reconociera el anticuerpo. Basándose en el epítipo mapeado de este modo, se diseñaron secuencias de aminoácidos para péptidos sintéticos. Para identificar adicionalmente residuos clave del epítipo (epítipo funcional) también se diseñaron para su síntesis péptidos con alanina sustituida en posiciones clave. La unión del anticuerpo a estos péptidos sintéticos se probó en Biacore y/o un espectrómetro de masas.

**Procedimiento para estudiar la unión de péptidos sintéticos a Acm mediante Biacore**

Los anticuerpos se enlazaron covalentemente a un chip CM5 de Biacore. Los péptidos se prepararon en el momento en tampón acetato de amonio 20 mM, a pH 7,0, a una concentración de 10 ug/ml. Estos péptidos se hicieron fluir sobre las superficies de anticuerpo a un caudal de 10 µl/min durante 15 minutos.

Como señales de blanco se usaron las uniones de los péptidos a controles de isotipo. Basándose en este enfoque, se identificaron péptidos con secuencias de antígeno nativas, así como con sustituciones de alanina, que se unían a los anticuerpos.

Se identificaron dos epítopos moleculares de dos poblaciones diferentes de Acm hu producidos por hibridomas, denominados Acm Z y Acm B. Cada uno de estos dos grupos de anticuerpos presenta unión selectiva al monómero o al dímero de SDF-1α. Los anticuerpos anti-SDF-1 1D3 y 1H2 son anticuerpos del grupo Acm B. Los anticuerpos anti-SDF-1 1C6 y 2A5 son anticuerpos del grupo Acm Z. El grupo Acm Z reconoce dos péptidos de epítipo, uno cerca de los residuos de aminoácido 7-19 de la región N-terminal que también es el sitio de unión a receptor conocido, y el otro en la tercera cadena beta entre los residuos 37-50. El grupo Acm B bloquea el sitio de unión a heparina, que se ha demostrado que es la interfaz del dímero de SDF-1α. Por inferencia a partir de los datos de BiaCore, el Acm B se une de forma predominante a la interfaz del dímero, entre los residuos 24-30 del primer y el segundo monómero, donde también se une la heparina. También se identificó mediante este ensayo basado en espectroscopía de masas un residuo clave, Arg8, implicado en la unión al epítipo con el Acm Z.

**Ejemplo 8: Procedimientos de Biacore y basados en fluorescencia para realizar un seguimiento de la variación de los estados oligoméricos de SDF-1 y la unión de Acm cuando se cambian las condiciones siguientes**

Para medir la unión de los anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 a SDF-1 monomérico se realizó un experimento de Biacore con una densidad baja de SDF-1 unido covalentemente a un chip CM5. Para 1C6 y 2A5, se midió la unión haciendo fluir el SDF-1 (Peptotech, Rocky Hill, NJ) en tampón PBS (pH 7,4) a concentraciones de 50, 40, 30, 20 y 10 nM. Para 1D3 y 1H2, se midió la unión haciendo fluir el SDF-1 (Peptotech, Rocky Hill, NJ) en tampón PBS (pH 7,4) a concentraciones de 500, 400, 300, 200 y 100 nM. Los datos se muestran en la tabla 6. El 1C6 y el 2A5 muestran una mayor afinidad de unión por la forma monomérica de SDF-1.

Tabla 6: Unión de anticuerpos monoclonales a SDF-1 monomérico

| Anticuerpo anti-SDF-1 | Afinidad $K_D \times 10^{-9}(M)$ | Velocidad de asociación $k_a \times 10^4 (1/Ms)$ | Velocidad de disociación $k_d \times 10^{-4} 1/s$ |
|-----------------------|----------------------------------|--|---|
| 1D3                   | 151                              | 1,1  | 17  |
| 1H2                   | 176                              | 0,91   | 16  |
| 1C6                   | 3,6                              | 11   | 4,0   |
| 2A5                   | 4,6                              | 9,6  | 4,5   |

Se realizó un seguimiento del efecto de la dilución de SDF-1 sobre la unión a anticuerpos monoclonales capturando los anticuerpos sobre un chip antiCH1 y midiendo después la respuesta de unión a SDF-1 después de 2 min de asociación en función del tiempo tras la dilución. Estos experimentos se realizaron en anticuerpos monoclonales 1D3 y 1C6 en PBS (pH 7,4) y el SDF-1 se diluyó de 12,5 µM a 100 nM.

Para determinar el efecto del pH, los iones  $Ca^{2+}$  y el EDTA sobre la unión de los anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 a SDF-1, se realizó un análisis Biacore. Los anticuerpos monoclonales anti-SDF-1 se unieron covalentemente a un chip CM5 (Biacore). En cada tampón, se hicieron fluir 100 nM de SDF-1 a través del chip y se midió la respuesta al final de una fase de asociación de 2 minutos en función del tiempo tras la dilución. Los tampones usados fueron HBS-EP (Biacore), HBS-P (carece de EDTA), PBS, PBS +  $CaCl_2$  1 mM y acetato de sodio a pH 5,5 + NaCl 150 mM.

El bloqueo de la unión de SDF-1 a sulfato de heparina se determinó capturando sulfato de heparina biotinilada (Sigma) sobre un chip de estreptavidina (Biacore, Uppsala, Suecia) y midiendo después la unión de SDF-1 con y sin exceso de anticuerpos monoclonales (1H2 y 2A5). Los experimentos se llevaron a cabo en PBS.

**Ejemplo 9: Actividad funcional medida por bloqueo de la unión de  $^{125}I$ -SDF-1α a células**

Se realizó una comparación de anticuerpos anti-SDF-1 $\alpha$  en cuanto al bloqueo de la unión de SDF-1 a células CEM mediante un ensayo estándar de unión de ligando radiomarcado. Se realizaron diluciones seriadas 1:3 de los anticuerpos anti-SDF-1 $\alpha$  para proporcionar un intervalo de concentraciones de 40 nM hasta 2 pM. Los anticuerpos se añadieron a células CEM en presencia de <sup>125</sup>I-SDF-1 100 pM con una actividad específica de 2000 Ci/mmol (de Amersham, n.º de catálogo IM314-25UCI). Como control negativo se usó un anticuerpo no pertinente con el mismo isotipo. El total posible de ligando radiomarcado unido se determinó dejando que el <sup>125</sup>I-SDF-1 se uniera a células CEM en ausencia de anticuerpos. La unión inespecífica del ligando radiomarcado se determinó dejando que el <sup>125</sup>I-SDF-1 se uniera en presencia de 1  $\mu$ M de SDF-1 no marcado (de Peprotech, n.º de catálogo 300-28A). Los resultados se muestran en la figura 10.

#### 10 **Ejemplo 10: Los anticuerpos anti-SDF-1 bloquean el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM**

Se marcaron células CEM con la tinción fluorescente de calcio Calcium 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los anticuerpos anti-SDF-1 se valoraron en una dilución seriada de 1:3 que dio como resultado un intervalo de concentraciones de 100 nM hasta 1 pM y se mezclaron con SDF-1 $\alpha$  50 nM (Peprotech, Rocky Hill, NJ) antes de cargarlos en la máquina Flexstation (Molecular Devices). Como control negativo se usó un anticuerpo no pertinente con el mismo isotipo. Después, se estimularon las células con las mezclas de SDF-1 $\alpha$ /anticuerpo. Las células sin anticuerpo se estimularon con SDF-1 $\alpha$  (preparado en solución salina tamponada de Hank con HBS o BSA al 0,1 %) para lograr la máxima señal de flujo de calcio posible. Para determinar un nivel basal, se estimularon las células con HBS con BSA al 0,1 %. La liberación de calcio estimulada por SDF-1 $\alpha$  se midió mediante fluorescencia dependiente de calcio en el tiempo. El área bajo la curva de la señal de fluorescencia resultante se refirió como indicación del flujo de calcio. La inhibición del flujo de calcio por los anticuerpos anti-SDF-1 resultante se representa en la figura 11. Se representaron los datos y se calcularon las CE50 usando el programa informático Prism de GraphPad y la fórmula de respuesta a dosis sigmoidal, de ajuste de curva no lineal.

#### 25 **Ejemplo 11: Los anticuerpos anti-SDF-1 bloquean la migración de células CEM inducida por SDF-1**

Se marcaron células CEM con el reactivo BATDA de Perkin Elmer. Los anticuerpos anti-SDF-1 se valoraron en una dilución seriada de 1:3 que dio como resultado un intervalo de concentraciones de 100 nM hasta 1 pM y se mezclaron con SDF-1 $\alpha$  5 nM (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Como control negativo se usó un anticuerpo no pertinente con el mismo isotipo. Se añadió SDF-1 $\alpha$  humano recombinante a 5 nM con o sin anticuerpos a la cámara inferior de una placa de migración de 96 pocillos de Neuroprobe con filtros de 5,7 mm de diámetro por pocillo. Cada pocillo contiene poros de 5  $\mu$ m. Se cargaron células CEM marcadas sobre los filtros a una concentración de 0,5 millones de células por pocillo. La placa de migración se incubó a 37 °C durante 2,5 horas. Las células migradas se capturan en la cámara inferior de la placa, se lisan y se detectan con solución de detección de europio de Perkin Elmer. La señal quimioluminiscente se registra en el instrumento Fusion. La inhibición de la migración inducida por SDF-1 $\alpha$  por los anticuerpos anti-SDF-1 resultante se muestra en la figura 12.

#### 35 **Ejemplo 12: Tratamiento de la artritis inducida por anticuerpos usando anticuerpos anti-SDF-1**

La artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones se usa ampliamente como modelo experimental de rastreo para artritis reumatoide en seres humanos. En este modelo, se inmuniza a los ratones con colágeno de tipo II que desencadena la producción de anticuerpos frente a regiones en particular de la molécula de colágeno de tipo II. El comienzo de la enfermedad es gradual y la duración mínima es de 6 semanas en el modelo clásico de AIC. Más recientemente, se identificaron 4 epítomos autoantigénicos del colágeno de tipo II y se usó un cóctel de 4 anticuerpos monoclonales generados contra estos epítomos para inducir la artritis. Una inyección de LPS 3 días después de la administración del anticuerpo anti-colágeno indujo una manifestación rápida de la enfermedad. En este modelo inducido por anticuerpo, el comienzo de la enfermedad es rápido y se puede realizar el estudio entero en 2 semanas. Este modelo inducido por anticuerpo presenta características similares a las que se encuentran en el modelo clásico de AIC, tales como infiltración extensa de células inflamatorias en el sinovio y el espacio articular, formación de granulación sinovial y destacada destrucción de tejidos óseos y cartilaginosos. De ahí que se usara este modelo para realizar un seguimiento de la eficacia de sustancias antiinflamatorias de una forma similar en un tiempo de estudio mucho menor que el del modelo clásico.

En este experimento se usaron ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad. En el día 0, a los ratones se les inyectaron 4 mg de cóctel de anticuerpos anti-colágeno (Arthrogen) seguido de una inyección de 25  $\mu$ g de LPS en el día 2. En los días 1, 4, 7 y 10, se trató a los ratones con los anticuerpos anti-SDF-1 de los inventores, anticuerpo de control de isotipo, PBS o el corticoesteroide, dexametasona a 15 mg/kg para anticuerpos y 0,3 mg/kg para dexametasona. Los anticuerpos anti-SDF-1 probados en este estudio fueron los clones 1H2, 2A5 y 1C6. El desarrollo de la artritis se puntuó en una escala de 0-4 mediante observación clínica (enrojecimiento e hinchazón) en los días 3, 5, 8, 10, 12 y 15. Las puntuaciones de gravedad son 0 para normal, 1 para enrojecimiento claro o hinchazón moderada del tobillo o la muñeca o hinchazón de un dedo, 2 para enrojecimiento e hinchazón de más de un dedo, 3 para enrojecimiento e hinchazón de la totalidad de la pata, metatarso, corvejón y/o carpio, 4 para pata inflamada, hinchada o deformada, con varias articulaciones implicadas. Se evaluaron puntuaciones de gravedad para las 4 patas, con una puntuación general total posible de 16 para cada animal. La hinchazón de las cuatro patas (grosor de la pata) se midió usando un calibre de precisión en los días 3, 5, 8, 10, 12 y 15.

Se recogieron muestras de sangre para preparar sueros de todos los ratones en dos ocasiones: antes de comenzar el tratamiento y antes de las autopsias. En el día 15 se sacrificaron los animales y se cortaron las dos patas posteriores aproximadamente 0,5 cm por encima del tobillo y se conservaron en formalina tamponada neutra al 10 % para el análisis histopatológico.

5 Los resultados se muestran en las figuras 13-1 a 13-3. La figura 13-1 muestra la puntuación media (A) y la anchura media de la pata (B) para cada ratón. La figura 13-2 muestra la puntuación media (C) y media de la pata (grosor) (D) en el día 15. La figura 13-3 muestra la puntuación media de enfermedad (E) y la puntuación media de enfermedad en el día 24 (F). Los ratones tratados con 2A5 (triángulo negro vertical) desarrollaron una enfermedad significativamente menos grave que los ratones tratados con control de isotipo (triángulo gris invertido). La gravedad de la enfermedad y la inflamación de la pata del grupo de control de isotipo fueron similares a las del control positivo, dexametasona (cuadrados grandes). Sin embargo, el grupo 1H2 y el grupo 1C6 no mostraron ningún beneficio con el tratamiento de anticuerpo y fueron comparables al control de isotipo. Un análisis estadístico para evaluar la significación de estos descubrimientos indicó que el efecto del grupo Z2A5 fue significativo a un valor de P de 0,0006, mientras que el efecto del grupo B1H2 no fue significativo (P = 0,346.)

### 15 **Ejemplo 13: Eficacia de anticuerpos anti-SDF-1 en el modelo de bolsa de aire de ratón**

Se desarrolló un modelo de bolsa de aire para probar la eficacia de anticuerpos anti-SDF-1. En este modelo *in vivo*, varios tipos celulares migran en respuesta a SDF-1 y su bolsa de aire proporciona un microentorno *in vivo* para la migración celular. Brevemente, se anestesió a los ratones y se creó una bolsa de aire mediante la inyección de aire estéril. En el día del estudio, se inyectó en la bolsa de aire SDF-1 alfa humano recombinante en ausencia o en presencia de anticuerpos anti-SDF-1. Se determinó la eficacia de los anticuerpos. En este ejemplo, se probaron los anticuerpos anti-SDF-1 2A5, 1C6, 1D3 y 1H2.

Se anestesiaron ratones hembra C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad (CRL) con isoflurano y se creó una bolsa de aire mediante la inyección de 5 ml de aire estéril por vía subcutánea en el dorso de los ratones. Tres días después, se inyectaron otros 3 ml de aire estéril. En el día 7, se inyectaron en un volumen de 1 ml, un ml de PBS o SDF-1 $\alpha$  solo (200 ng, PeproTech) o SDF-1 $\alpha$  más control de isotipo de IgG4 humana o SDF-1 $\alpha$  más 50  $\mu$ g o 100  $\mu$ g de anticuerpos anti-SDF-1. En cada grupo de prueba se usaron cinco ratones. Cuatro horas después, se sacrificaron los ratones por asfixia usando CO<sub>2</sub> y se lavaron las bolsas con 2 ml de PBS/EDTA 5 mM seguido de dos lavados adicionales con 3 ml de PBS/EDTA 5 mM. Se centrifugaron los exudados a 500 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se contaron las células con un hemocitómetro y se realizaron recuentos diferenciales de subpoblaciones de leucocitos en una preparación en Cytospin teñida con el kit de tinción Kwik-Diff (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

Los resultados se muestran en la figura 14. Los resultados mostraron que el SDF-1 $\alpha$  a 400 ng inducía la migración de leucocitos hacia la bolsa de aire y que el número total de leucocitos aumenta normalmente 2-3 veces en comparación con bolsas de aire que se rellenan con PBS. Los anticuerpos anti-SDF-1 administrados a una concentración de 100  $\mu$ g/ml, bloquearon totalmente la migración celular hasta el nivel observado con PBS solo (figura 14A). El anticuerpo de control de isotipo no tuvo ningún efecto. En la figura 14B se midió el porcentaje de neutrófilos (Neu) o monocitos/linfocitos (otros) que migraron. La mayoría de las células que migraron, representadas por los neutrófilos, se bloquean con anticuerpos anti-SDF-1. Los monocitos y linfocitos también se bloquean. A esta concentración de anticuerpo, no se observaron diferencias en la actividad de bloqueo de los anticuerpos probados.

40 En el estudio siguiente la concentración de SDF-1 usada para inducir la migración se redujo a 200 ng y la concentración de anticuerpos se probó tanto a 100  $\mu$ g/ml como a un nivel reducido de 50  $\mu$ g/ml. Tanto 2A5 como 1C6 a 50  $\mu$ g y 100  $\mu$ g bloquearon la migración de neutrófilos, linfocitos y monocitos (figura 15). Las cantidades de neutrófilos, linfocitos y monocitos se redujeron totalmente a niveles de PBS. La potencia fue similar entre los dos anticuerpos a esta concentración. El control de isotipo a 100  $\mu$ g no tuvo ningún efecto.

45 En resumen, los anticuerpos anti-SDF-1 2A5, 1C6, 1H2 y 1D3 son inhibidores potentes de la migración celular *in vivo*.

### **Ejemplo 14: Estudio de tecnología de ensayo fluorimétrico de microvolúmenes FMAT**

En este ejemplo, se estudió la unión de anticuerpos anti-SDF-1 a SDF-1 en presencia de células HuVEC. Las células HuVEC contienen glucosaminoglucanos (GAG) a los que se une el SDF-1.

50 Se plaquearon células HuVEC (células endoteliales de vena umbilical humana, de Cambrex, P/N CC-2519) a  $1 \times 10^4$  células por pocillo en 200  $\mu$ l por pocillo de medio de cultivo (Cambrex, P/N CC-3124, con FBS extra añadido hasta un 10 % final) sobre placas de 96 pocillos negras, de fondo transparente, opacas y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> durante la noche. El sobrenadante celular se retira con cuidado. El antígeno y el anticuerpo se diluyen a una concentración 4x. Se añaden 50  $\mu$ l de tampón de ensayo (PBS más FBS al 0,5 %), 50  $\mu$ l de SDF-1 $\alpha$  hr (PeproTech, P/N 300-28A), 50  $\mu$ l de anticuerpo y 50  $\mu$ l de Alexa Fluor 647 de cabra anti-IgG humana (H+L) (Invitrogen, P/N 21445) o de cabra anti-IgG de ratón (H+L) (Invitrogen, P/N 21235) diluido 1:3000. Se cubre la placa con papel de aluminio a temp. ambiente durante 2 horas. Se lee con un FMAT 8200 de Applied Biosystems. Los resultados se muestran en la figura 16. Este experimento muestra que los anticuerpos anti-SDF-1 1C6 y 2A5 presentan una mejor

unión a SDF-1 unido a GAG que los anticuerpos anti-SDF-1 1D3 y 1H2, lo que indica que los anticuerpos 1D3 y 1H2 se unen a una región de epítipo que solapa con el sitio de unión a GAG.

**Ejemplo 15: Bloqueo de la unión de <sup>125</sup>I-SDF-1α a GAG en células que no expresan CXCR4.**

5 En este ejemplo, se prueba la unión de SDF-1α a glucosaminoglucanos (GAG) inespecíficos usando anticuerpos anti-SDF-1.

10 Se realizó una comparación de anticuerpos anti-SDF-1 en cuanto al bloqueo de la unión de SDF-1 a células HuVEC de la ATCC (n.º de cat. CRL-1730) mediante un ensayo estándar de unión de ligando radiomarcado. Se realizaron diluciones seriadas 1:3 de los anticuerpos anti-SDF-1 para proporcionar un intervalo de concentraciones de 10 nM hasta 0,5 pM. Los anticuerpos se añadieron a células HuVEC en presencia de <sup>125</sup>I-SDF-1α 100 pM con una actividad específica de 2000 Ci/mmol (de Amersham, n.º de catálogo IM314-25UCI). Como control negativo se usó un anticuerpo no pertinente con el mismo isotipo. El total posible de ligando radiomarcado unido se determinó dejando que el <sup>125</sup>I-SDF-1α se uniera a células HuVEC en ausencia de anticuerpos. La unión inespecífica del ligando radiomarcado se determinó dejando que el <sup>125</sup>I-SDF-1α se uniera en presencia de 1 μM de SDF-1α humano recombinante no marcado (de Peprotech, n.º de catálogo 300-28A). Las células HuVEC no expresan CXCR4 y, por tanto, sólo se da unión inespecífica de SDF-1α a estas células, presumiblemente a través de GAG. Los resultados se muestran en la figura 17.

**Ejemplo 16: Los anticuerpos anti-SDF-1 bloquean la formación de tubos capilares por HUVEC**

En este ejemplo, se probó el efecto de anticuerpos anti-SDF-1 sobre la formación de puntos de conexión de tubos capilares entre células HuVEC.

20 Se diluye Matrigel con RPMI 1:1, se plaquea sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos y se deja que polimerice durante 30 minutos a 37 °C. Se tripsinizan HuVEC (de Cambrex, n.º de cat. CC-2519) al 80 % de confluencia y se resuspenden a 1 x 10<sup>6</sup> células por ml en RPMI con FBS al 0,5 %. Los anticuerpos se mezclan bien con las HuVEC a una concentración final de 3 μg/ml y se dejan incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como control negativo se usó un anticuerpo no pertinente del mismo isotipo o medio. Como control positivo de la inhibición de la formación de tubos, se usó un anticuerpo de ratón anti-αVβ3 humana (CD51/CD61) (de R&D Systems, n.º de cat. MAB3050). Se plaquearon HuVEC con o sin anticuerpos sobre los pocillos recubiertos de Matrigel y se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

30 Las HuVEC incubadas con medio o control de isotipo formaron tubos capilares que dieron lugar a la aparición de células conectadas a través de la placa con 3-5 puntos de conexión o puntos de ramificación por célula. Las HuVEC incubadas con Ac anti-SDF-1 o anticuerpo anti-αVβ3 no formaron tubos capilares. Las células aparecen aisladas y con pocos o ningún punto de ramificación. El anticuerpo anti-SDF-1 1H2 proporcionó muy pocos puntos de ramificación, mientras que el 2A5 produjo algunos puntos de ramificación en un porcentaje pequeño de las células.

**Sumario del listado de secuencias**

| SEQ ID NO: | SECUENCIA               | SEQ ID NO: | SECUENCIA               |
|------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| 1          | aa de VH de 1D3         | 21         | aa de CDR1 de VK de 1D3 |
| 2          | aa de VH de 1H2         | 22         | aa de CDR1 de VK de 1H2 |
| 3          | aa de VH de 1C6         | 23         | aa de CDR1 de VK de 1C6 |
| 4          | aa de VH de 2A5         | 24         | aa de CDR1 de VK de 2A5 |
| 5          | aa de VK de 1D3         | 25         | aa de CDR2 de VK de 1D3 |
| 6          | aa de VK de 1H2         | 26         | aa de CDR2 de VK de 1H2 |
| 7          | aa de VK de 1C6         | 27         | aa de CDR2 de VK de 1C6 |
| 8          | aa de VK de 2A5         | 28         | aa de CDR2 de VK de 2A5 |
| 9          | aa de CDR1 de VH de 1D3 | 29         | aa de CDR3 de VK de 1D3 |
| 10         | aa de CDR1 de VH de 1H2 | 30         | aa de CDR3 de VK de 1H2 |
| 11         | aa de CDR1 de VH de 1C6 | 31         | aa de CDR3 de VK de 1C6 |
| 12         | aa de CDR1 de VH de 2A5 | 32         | aa de CDR3 de VK de 2A5 |
| 13         | aa de CDR2 de VH de 1D3 | 33         | nt de VH de 1D3         |
| 14         | aa de CDR2 de VH de 1H2 | 34         | nt de VH de 1H2         |
| 15         | aa de CDR2 de VH de 1C6 | 35         | nt de VH de 1C6         |
| 16         | aa de CDR2 de VH de 2A5 | 36         | nt de VH de 2A5         |
| 17         | aa de CDR3 de VH de 1D3 | 37         | nt de VK de 1D3         |
| 18         | aa de CDR3 de VH de 1H2 | 38         | nt de VK de 1H2         |
| 19         | aa de CDR3 de VH de 1C6 | 39         | nt de VK de 1C6         |

ES 2 396 220 T3

|    |                                      |    |                                |
|----|--------------------------------------|----|--------------------------------|
| 20 | aa de CDR3 de VH de 2A5              | 40 | nt de VK de 2A5                |
|    |                                      |    |                                |
| 41 | aa de VH 1-24 de línea germinal      | 42 | aa de VH 3-7 de línea germinal |
| 43 | aa de VK L18 de línea germinal       | 44 | aa de SDF-1 alfa               |
| 45 | aa de SDF-1 beta                     | 46 | aa de SDF-1 gamma              |
| 47 | aa de JH6b de línea germinal         | 48 | aa de JH6b de línea germinal   |
| 49 | aa de JK4 de línea germinal          | 50 | aa de JK1 de línea germinal    |
| 51 | aa de enlazador sintético de Gly-Ser |    |                                |

**Listado de secuencias**

<110> Ono Pharmaceutical Co., LTD.

<110> Medarex, Inc.

5

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE AL FACTOR 1 DERIVADO DEL ESTROMA (SDF-1)

<130> PH-3235-PCT

10

<140>

<141>

<150> 60/837,004

<151> 2006-08-11

15

<160> 51

<170> PatentIn Ver. 3.3

20

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

**Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**  
**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Lys Leu**  
**20 25 30**  
**Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met**  
**35 40 45**  
**Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe**  
**50 55 60**  
**Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr**  
**65 70 75 80**

ES 2 396 220 T3

Met Glu Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

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

<210> 2

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Leu  
 20 25 30

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

Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

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

10

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

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

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

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

Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

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

<210> 4

10 <211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

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

<210> 5

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 6

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 396 220 T3

<400> 7

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 8

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
20 25 30

6/26

10

ES 2 396 220 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 9

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

10 Lys Leu Ser Val His  
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400>.10

20 Lys Leu Ser Val His  
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 396 220 T3

Ser Tyr Trp Met Ser  
1 5

<210> 12

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

10 Ser Tyr Trp Met Ser  
1 5

<210> 13

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

20 Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

30 Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

- 5 <210> 16
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 16  
 Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

- 15 <210> 17
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

20 <400> 17  
 Glu Gly Gln Trp Leu Val Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 18

- 25 <211> 13
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 18

30 Glu Gly Gln Trp Leu Val Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

- 35 <213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

20

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 23

30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

35

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 24

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 25

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

15 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 26

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

25 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

35

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

5 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 29

15 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 30

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

25 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 31

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 32

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 396 220 T3

<400> 32

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
 1 5

5 <210> 33

<211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 33

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ctc act aaa tta 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Lys Leu  
 20 25 30

tcc gtg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt gag tgg atg 144  
 Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

15

ES 2 396 220 T3

gga agt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac tca cag agg ttc 192  
 Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe  
           50                          55                          60

cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc tac 240  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
           65                          70                          75                          80

atg gag ctg acc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                          90                          95

gca acg gag ggg cag tgg ctg gta gcc tac tac ggt atg gac gtc tgg 336  
 Ala Thr Glu Gly Gln Trp Leu Val Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
                           100                          105                          110

ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 366  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
           115                          120

<210> 34

<211> 366

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(366)

<400> 34

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
           1                          5                          10                          15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ttc act aaa tta 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Leu  
                           20                          25                          30

tcc gtg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt gag tgg atg 144  
 Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 396 220 T3

gga agt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca atc tac tca cag agg ttc 192  
 Gly Ser Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Gln Arg Phe  
           50                          55                          60

cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc tac 240  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
           65                          70                          75                          80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                          90                          95

gca acg gag ggg cag tgg ctg gta gcc tac tac ggt atg gac gtc tgg 336  
 Ala Thr Glu Gly Gln Trp Leu Val Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
                           100                          105                          110

ggc caa ggg acc atg gtc acc gtc tcc tca 366  
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
           115                          120

<210> 35

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(372)

<400> 35

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg aga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Arg Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
           1                          5                          10                          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                           20                          25                          30

ES 2 396 220 T3

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
           35                          40                          45

gcc aac atg aat caa gat gga agt gag aaa tac tat gtg gac tct gtg 192  
 Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
           50                          55                          60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
           65                          70                          75                          80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                          90                          95

gcg agg gat cta act ggg cca tat tac tat gac tac tac ggt atg gac 336  
 Ala Arg Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp  
                           100                          105                          110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
           115                          120

<210> 36

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. 372)

<400>36

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
           1                          5                          10                          15

ES 2 396 220 T3

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                  25                  30

tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct oca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                  40                  45

gcc aac atg aat caa gat gga agt gag aaa tac tat gtg gac tct gtg 192  
 Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
                   50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
                   65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95

gog agg gat cta act ggg cca tat tac tat gac tac tac ggt atg gac 336  
 Ala Arg Asp Leu Thr Gly Pro Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp  
                   100                  105                  110

gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120

<210> 37

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(321)

<400> 37

gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48



ES 2 396 220 T3

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
                   20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                  40                  45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
                   65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac ccg ctc 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
                   85                  90                  95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                  105

<210> 39

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(321)

<400> 39

gcc atc cgg atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gta gga 48  
 Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
           1                  5                  10                  15

ES 2 396 220 T3

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
                   20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aca cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                  40                  45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
                   65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cct cgg 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg  
                   85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                  105

<210> 40

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(321)

<400> 40

gac atc cag atg atc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
                   1                  5                  10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96

ES 2 396 220 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
                   20                                  25                                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                                  40                                  45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                                  55                                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
                   65                                  70                                  75                                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cct cgg 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Arg  
                                   85                                  90                                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                                  105

<210> 41

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu  
                   20                                  25                                  30

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

ES 2 396 220 T3

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr

<210> 42

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

10

<210> 43

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 396 220 T3

<400> 43

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
                   20                    25                    30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
                   65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro  
                   85                    90                    95

5 <210> 44

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 44

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu  
 1                    5                    10                    15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys  
                   20                    25                    30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys  
                   35                    40                    45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys  
                   50                    55                    60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln  
 . 65                    70                    75                    80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys  
                   85

<210> 45

<211> 93

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

```

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
  1           5           10          15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
          20           25           30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
          35           40           45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
          50           55           60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
          65           70           75           80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
          85           90
    
```

10 <210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 46

```

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
  1           5           10          15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
    
```

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys  
 35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys  
 50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln  
 65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val  
 85 90 95

Gly Lys Lys Glu Lys Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys  
 100 105 110

Ala Ala Gln Lys Arg Lys Asn  
 115

<210> 47

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 1 5 10 15

Ser

10

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 48

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 1 5 10 15

20

Thr Val Ser Ser  
 20

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 49

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 50

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 51

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: Enlazador sintético de Gly-Ser

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

30

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a SDF-1 humano y comprende:

- 5 (i) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29,
- 10 (ii) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30.
- 15 (iii) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, o
- 20 (iv) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32,
- 25 30

en el que el SDF-1 humano es el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 44.

35 2. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende:

- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5,
- 40 (b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6,
- (c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, o
- 45 (d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

50 3. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

4. El anticuerpo monoclonal aislado, o porciones de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

5. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, que

- comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.
- 5 6. El anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 2, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
7. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un anticuerpo humano.
8. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que se une a SDF-1 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M o menos.
- 10 9. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 3 ó 4, que se une a la interfaz del dímero entre los residuos de aminoácido 24-30 de SDF-1.
10. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 5 ó 6, que se une tanto a los residuos de aminoácido 7-19 de la región N-terminal como a la tercera cadena beta entre los residuos de aminoácido 37-50 del SDF-1.
- 15 11. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento del cáncer.
12. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, para el uso de la reivindicación 11, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, mieloma múltiple, linfomas, melanoma, cáncer renal, tumores cerebrales, leucemias crónicas o agudas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o el cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer del recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, tumores sólidos infantiles, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el amianto y combinaciones de dichos cánceres.
- 20 25 30 13. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.
14. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, para el uso de la reivindicación 13, en el que el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), osteoartritis (OA), encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), esclerosis múltiple (EM), psoriasis, tiroiditis autoinmunitaria, glomerulonefritis y rechazo de trasplante.
- 35 40 15. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de retinopatía diabética proliferativa.
16. Una composición que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

# Fig. 1A

## VH de 1D3 anti-SDF-1

segmento V : 1-24  
 segmento D : 6-19  
 segmento J : JH6b

### cebador codificado

```

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K
1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG
                                CDR1
V S C K V S G Y T L T K L S V H W V R
58 GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT AAA TTA TCC GTG CAC TGG GTG CGA
                                CDR2
Q A P G K G L E W M G S F D P E D G E
115 CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGT TTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA
                                CDR2
T I Y S Q R F Q G R V T M T E D T S T
172 ACA ATC TAC TCA CAG AGG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA
D T A Y M E L T S L R S E D T A V Y Y
229 GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG ACC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC
                                CDR3
C A T E G Q W L V A Y Y G M D V W G Q
286 TGT GCA ACG GAG GGG CAG TGG CTG GTA GCC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
G T T V T V S S
343 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

Fig. 1B

VK de 1D3 anti-SDF-1

segmento V: L18

segmento J: JK4

cebador codificado

```

E I V L T Q S P S S L S A S V G D R V
1 GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC
      CDR1
T I T C R A S Q G I S S A L A W Y Q Q
58 ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG CAG
      CDR2
K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G
115 AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG
V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
172 GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC
      CDR3
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
229 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG
      CDR3
L T F G G G T K V E I K
286 CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

## Fig. 2A

## VH de 1H2 anti-SDF-1

segmento V: 1-24  
 segmento D: 6-19  
 segmento J: JH6b

## cebador codificado

```

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG
                                CDR1
V S C K V S G Y T F T K L S V H W V R
58 GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC TTC ACT AAA TTA TCC GTG CAC TGG GTG CGA
                                CDR2
Q A P G K G L E W M G S F D P E D G E
115 CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA AGT TTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA
                                CDR2
T I Y S Q R F Q G R V T M T E D T S T
172 ACA ATC TAC TCA CAG AGG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA
D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
229 GAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACC GCC GTG TAT TAC
                                CDR3
C A T E G Q W L V A Y Y G M D V W G Q
286 TGT GCA ACG GAG GGG CAG TGG CTG GTA GCC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
G T M V T V S S
343 GGG ACC ATG GTC ACC GTC TCC TCA

```



# Fig. 3A

## VH de 1C6 anti-SDF-1

segmento V : 3-7  
 segmento D : 7-27  
 segmento J : JH6b

### cebador codificado

1 E V Q L V E S G R G L V Q P G G S L R  
 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG AGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA

#### CDR1

58 L S C A A S G F T F S S Y W M S W V R  
 CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC

#### CDR2

115 Q A P G K G L E W V A N M N Q D G S E  
 CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATG AAT CAA GAT GGA AGT GAG

#### CDR2

172 K Y Y V D S V K G R F T I S R D N A K  
 AAA TAC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG

N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y  
 AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACC GCT GTG TAT TAC

#### CDR3

286 C A R D L T G P Y Y D Y Y G M D V W  
 TGT GCG AGG GAT CTA ACT GGG CCA TAT TAC TAT GAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG

G Q G T T V T V S S  
 343 GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA



Fig. 4A

VH de 2A5 anti-SDF-1

segmento V : 3-7  
 segmento D : 7-27  
 segmento J : JH6b

cebador codificado

```

    ~~~~~
    Q V Q L V Q S G G L V Q P G G S L R
    1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA
    ~~~~~
    ~~~~~
    L S C A A S G F T F S S Y W M S W V R
    58 CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT TGG ATG AGC TGG GTC CGC
    ~~~~~
    ~~~~~
    Q A P G K G L E W V A N M N Q D G S E
    115 CAG GCT CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC ATG AAT CAA GAT GGA AGT GAG
    ~~~~~
    ~~~~~
    K Y Y V D S V K G R F T I S R D N A K
    172 AAA TAC TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG
    N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
    229 AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC
    ~~~~~
    ~~~~~
    C A R D L T G P Y Y D Y Y G M D V W
    286 TGT GCG AGG GAT CTA ACT GGG CCA TAT TAC TAT GAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG
    G Q G T T V T V S S
    343 GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```





Fig. 6

Región VH de 2A5 y 1C6 anti-SDF-1

|              | <i>cebador codificado</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <i>CDR1</i> |   |   |   |   |   |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------|---|---|---|---|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-7 1.germ.  | E                         | V | Q | L | V | E | S | G | G | L | V           | Q | P | G | G | S | L      | R | L | S | C | A | S | G | F | T | F | S | S | Y | W | M | S | W |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 1C6 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | R | -           | - | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |
| 2A5 VH       | Q                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |
|              | <i>CDR2</i>               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |             |   |   |   |   |   |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-7 1.germ.  | V                         | R | Q | A | P | G | K | G | L | E | W           | V | A | N | I | K | Q      | D | G | S | E | K | Y | Y | V | D | S | V | K | G | R | F | T | I | S | R |   |   |   |   |   |   |
| 1C6 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | M | N | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |
| 2A5 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | M           | N | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |
|              | <i>CDR3</i>               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |             |   |   |   |   |   |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-7 1.germ.  | D                         | N | A | K | N | S | L | Y | L | Q | M           | N | S | L | R | A | E      | D | T | A | V | Y | Y | C | A | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6b 1.germ. | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Y | Y | Y | Y |   |
| 1C6 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| 2A5 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|              | <i>CDR3</i>               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |             |   |   |   |   |   |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6b 1.germ. | Y                         | G | M | D | V | W | G | Q | G | T | T           | V | T | V | S | S |        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 1C6 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | (JH6b) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 2A5 VH       | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | (JH6b) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Fig. 7

Región VK de 1H2 y 1D3 anti-SDF-1

|             | <i>cebador codificado</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <i>CDR1</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L18 1.germ. | A                         | I | Q | L | T | Q | S | P | S | S | L           | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C | R | A | S | Q | G | I | S |   |
| 1D3 VK      | E                         | - | V | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| 1H2 VK      | E                         | - | V | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| L18 1.germ. | A                         | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G | K           | A | P | K | L | L | I | Y | D | A | S | S | L | E | S | G | V | P | S | R | F |
| 1D3 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1H2 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18 1.germ. | S                         | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L           | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | C | Q | Q | F | N | N |   |
| 1D3 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1H2 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18 1.germ. | Y                         | P | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| JK4 1.germ. | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1D3 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1H2 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fig. 8

Región VK de 2A5 y 1C6 anti-SDF-1

|             | <i>cebador codificado</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <i>CDR1</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
|-------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|
| L18 1.germ. | A                         | I | Q | L | T | Q | S | P | S | S | L           | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C | R | A | S | Q | G | I | S | S |   |       |
| 1C6 VK      | -                         | - | R | M | - | - | - | - | - | - | V           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
| 2A5 VK      | D                         | - | - | M | I | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
|             |                           |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <i>CDR2</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
| L18 1.germ. | A                         | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G | K           | A | P | K | L | L | I | Y | D | A | S | S | L | E | S | G | V | P | S | R | F |   |       |
| 1C6 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | T | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
| 2A5 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
|             |                           |   |   |   |   |   |   |   |   |   | <i>CDR3</i> |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
| L18 1.germ. | S                         | G | S | G | S | G | T | D | F | T | L           | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q | Q | F | N | N |   |       |
| 1C6 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
| 2A5 VK      | -                         | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |       |
|             | <u>Y P</u>                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
| L18 1.germ. |                           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
| JK1 1.germ. |                           |   | W | T | F | G | Q | G | T | K | V           | E | I | K |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |
| 1C6 VK      | -                         | - | R | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (JK1) |
| 2A5 VK      | -                         | - | R | - | - | - | - | - | - | - | -           | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (JK1) |

Fig. 9

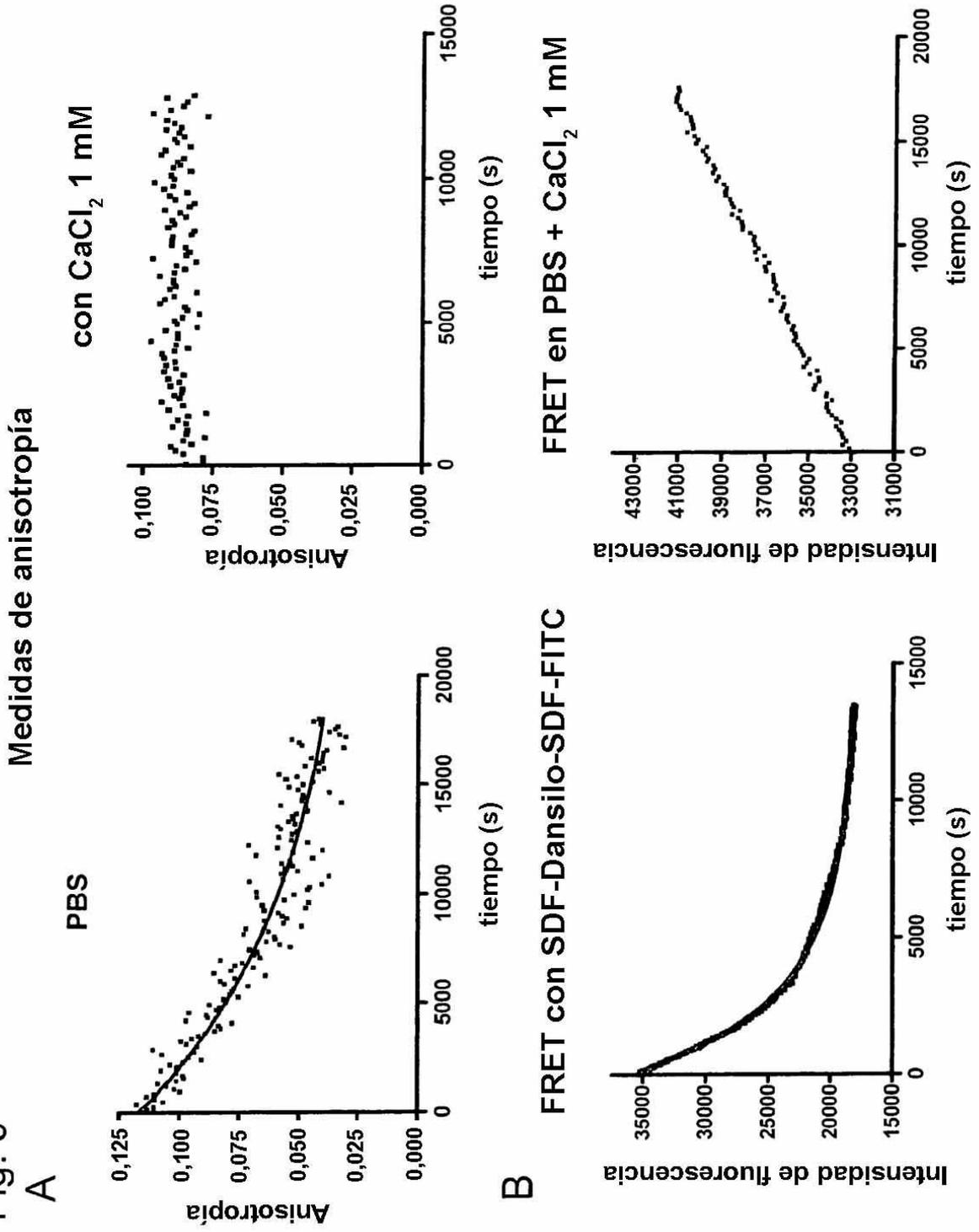


Fig. 10

Bloqueo de la unión de <sup>125</sup>I-SDF-1 a células CEM

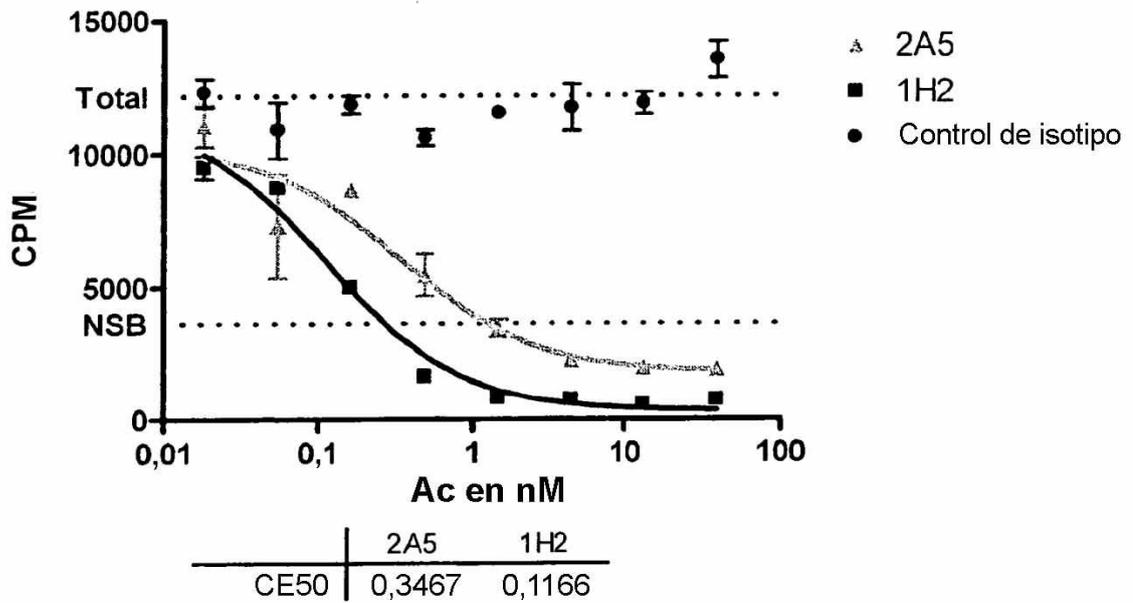


Fig. 11

**Bloqueo del flujo de calcio inducido por SDF-1 en CEM**

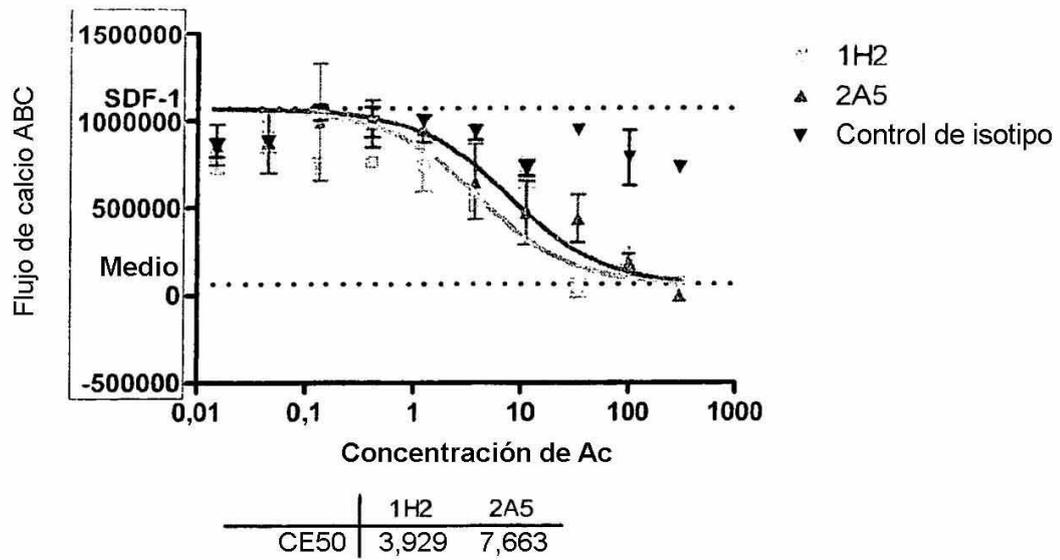


Fig. 12

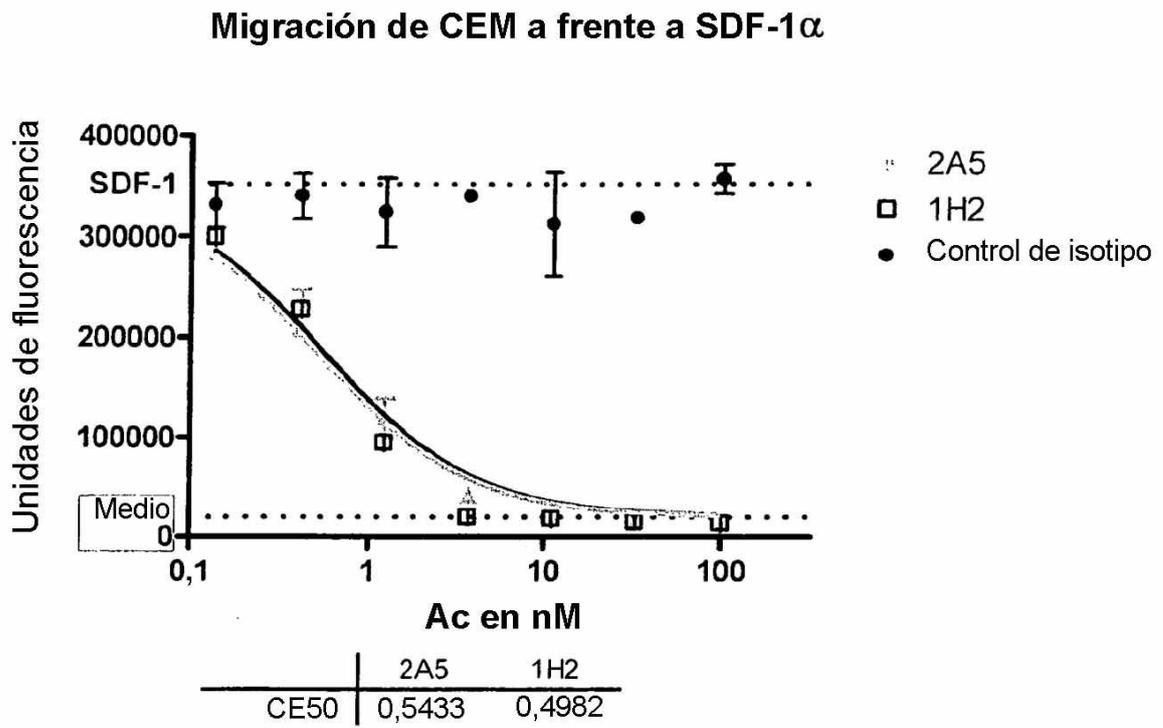
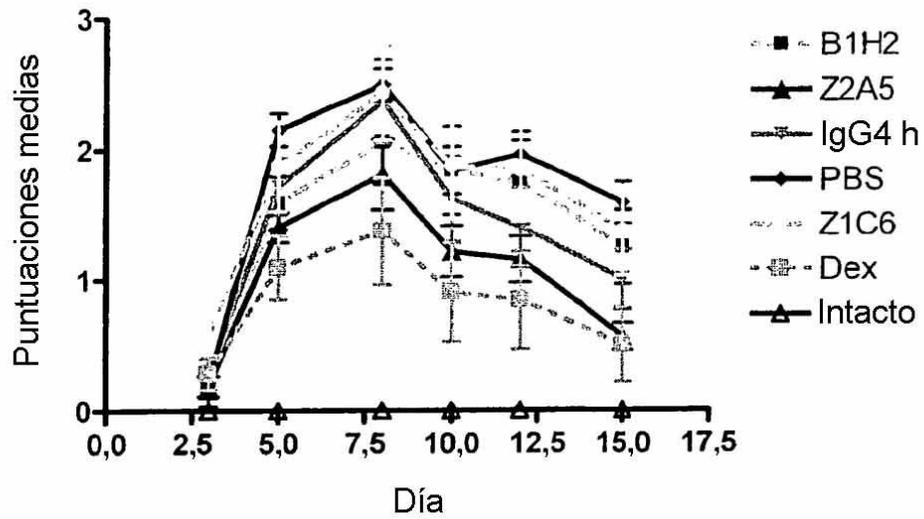


Fig. 13-1

A

Puntuaciones medias (máx = 4)



B

Anchura media de la pata

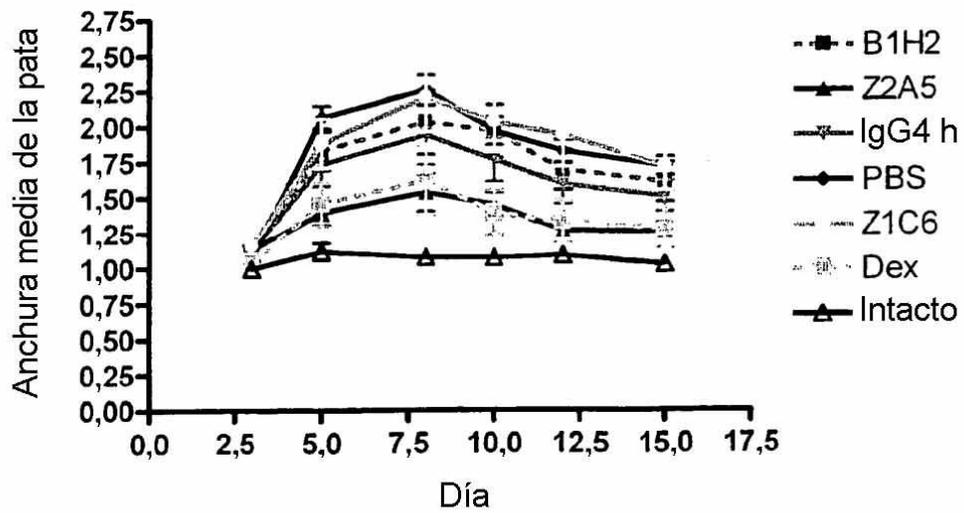
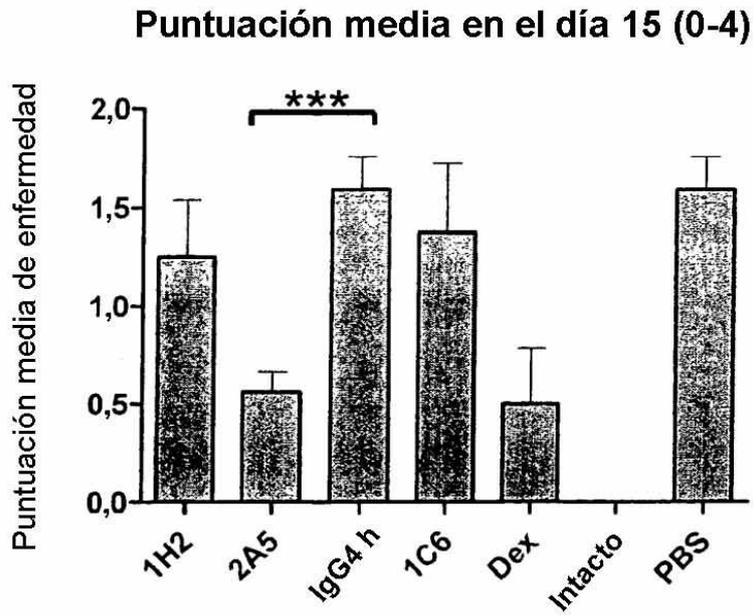


Fig. 13-2

C



D

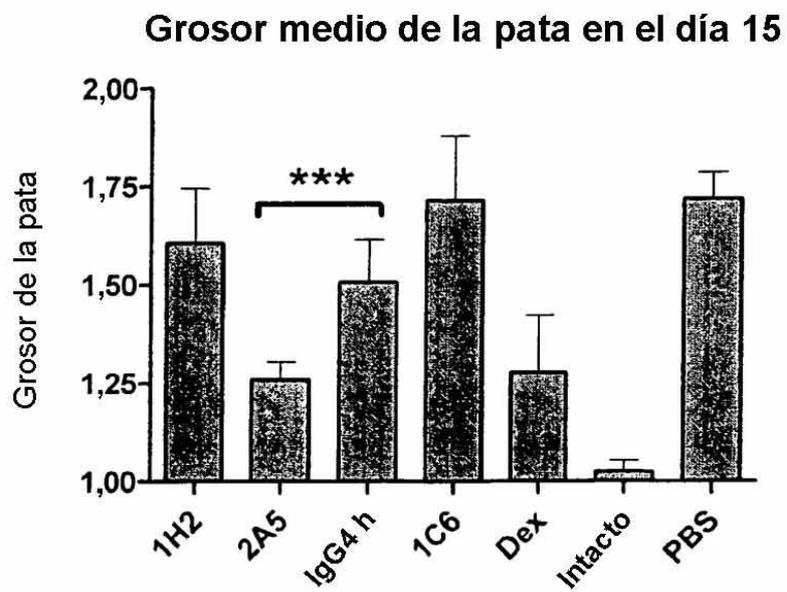
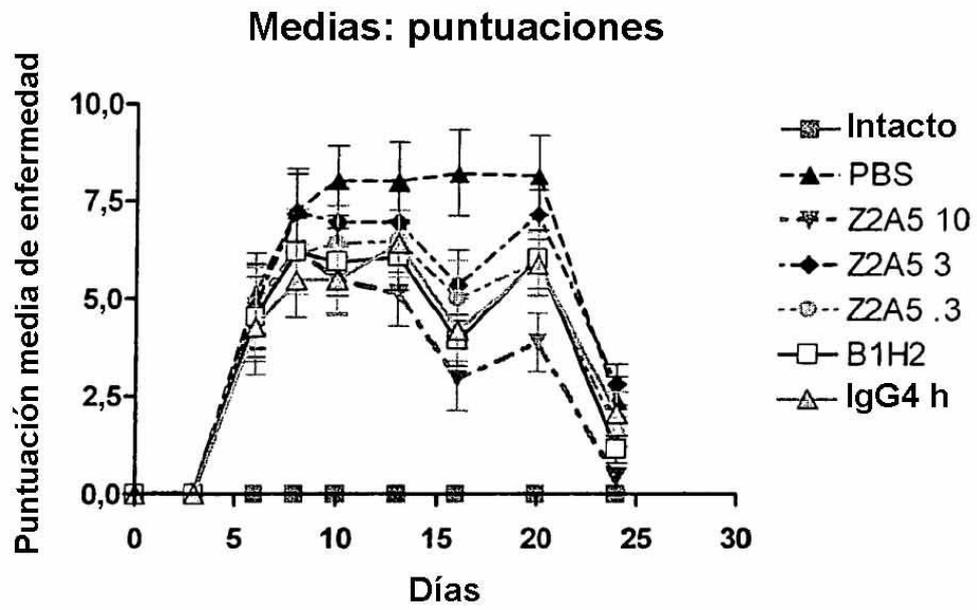


Fig. 13-3

E



F

**Día 24: puntuación media de enfermedad**

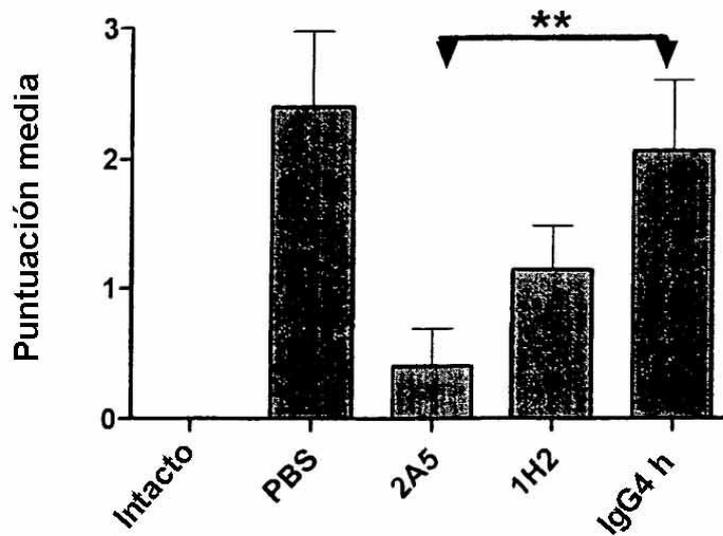


Fig. 14

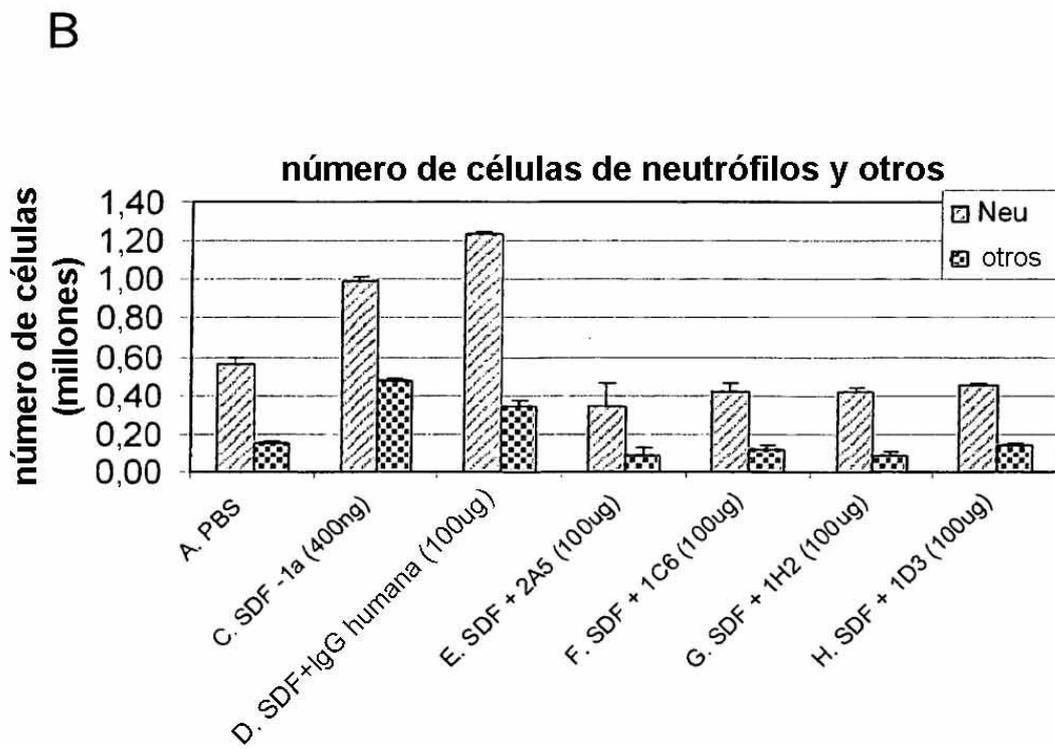
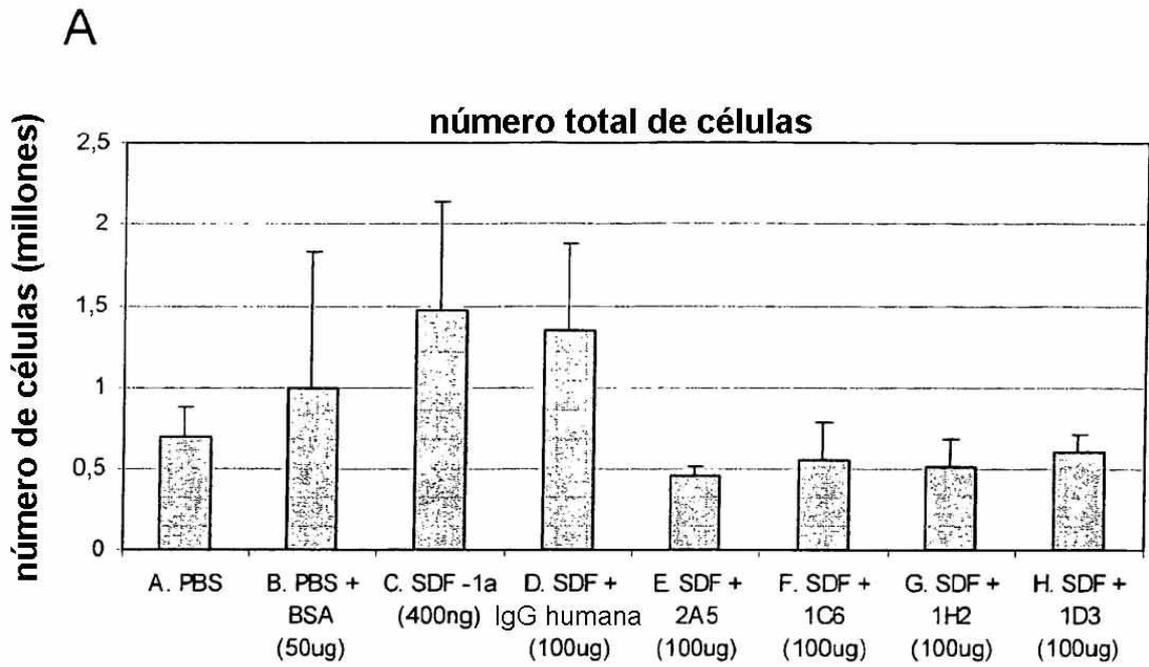


Fig. 15

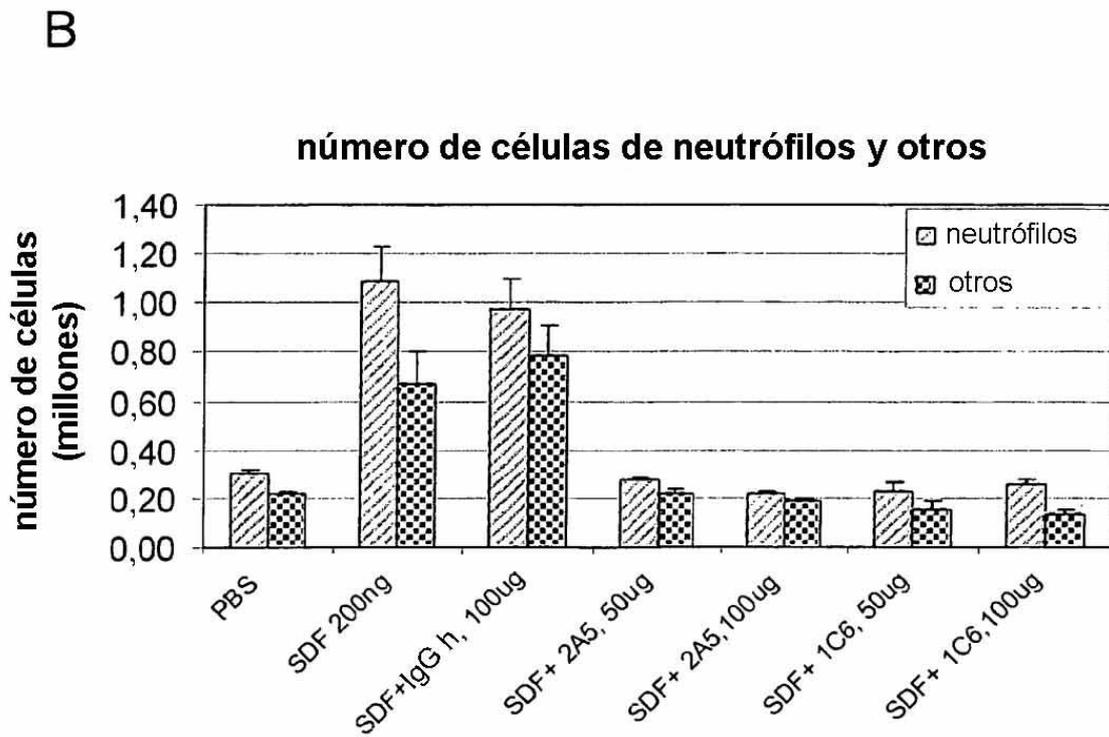
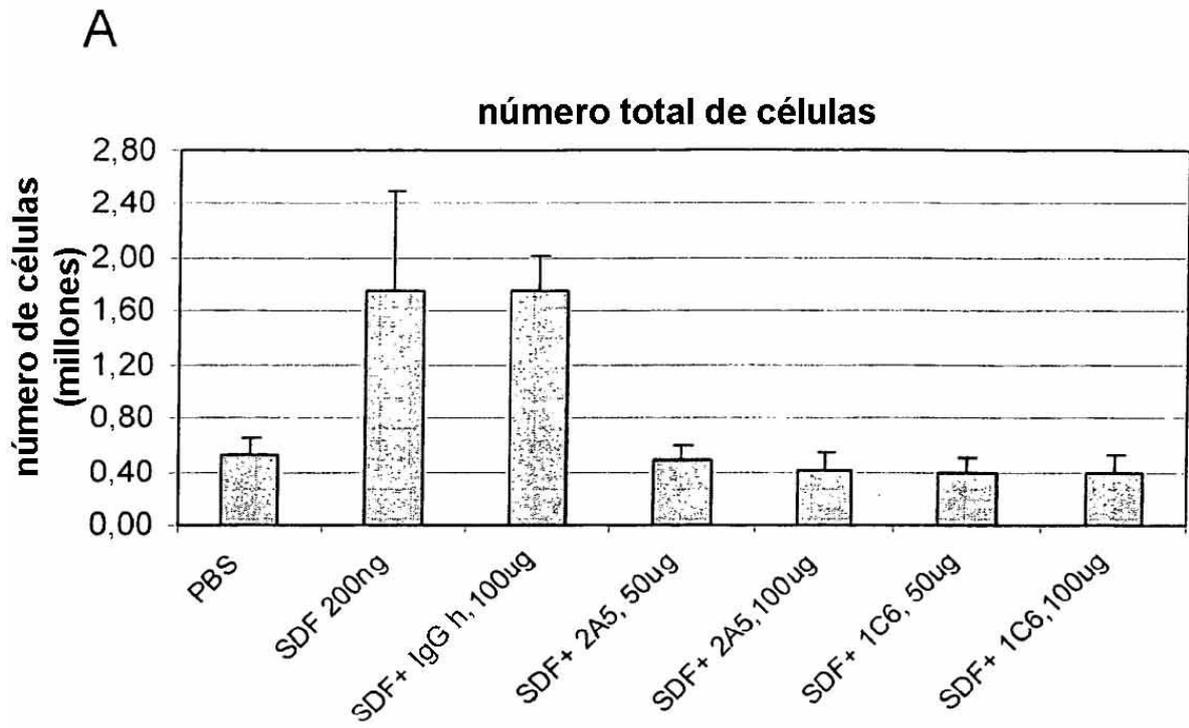


Fig. 16

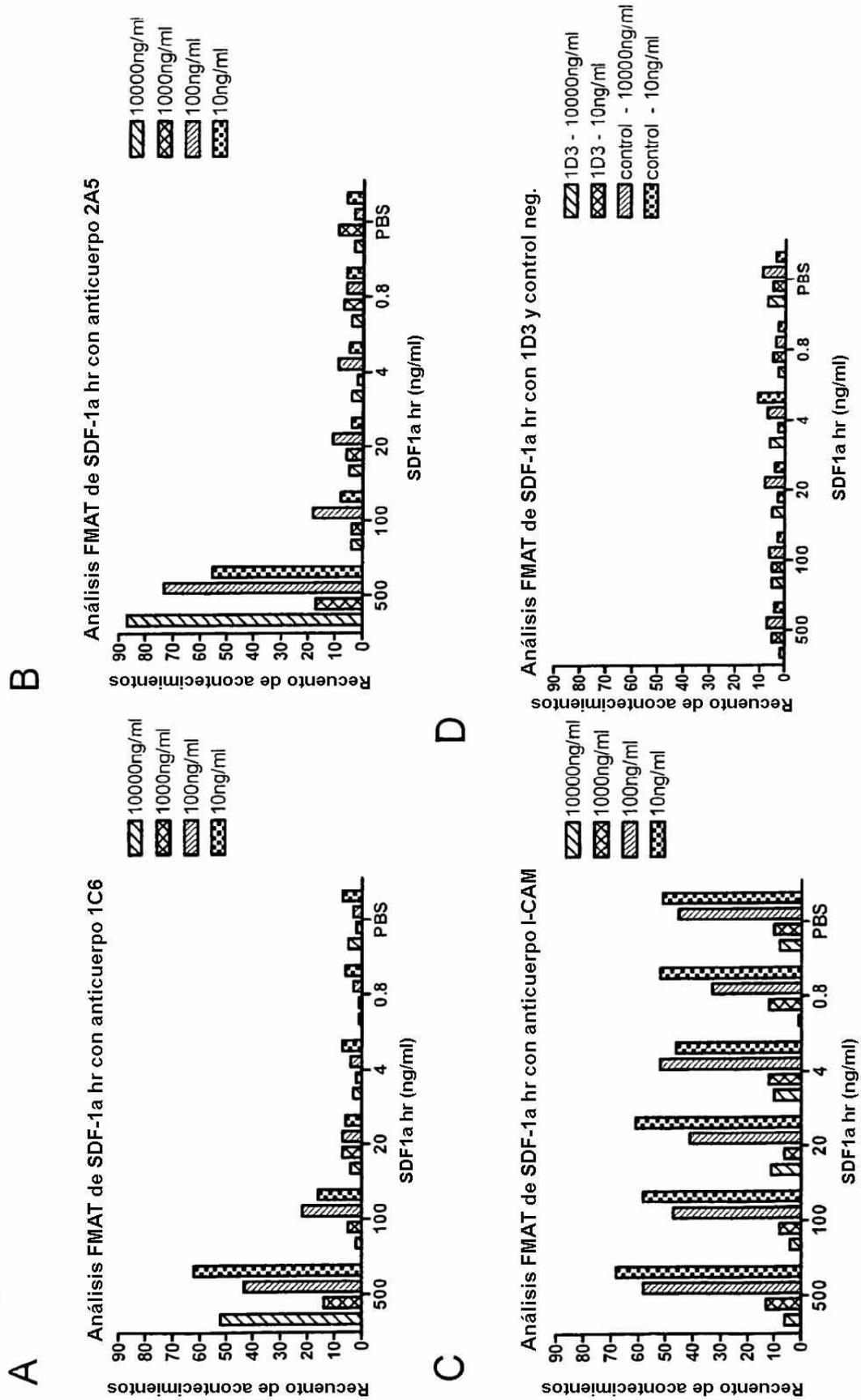


Fig. 17

