(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 553 553**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2007** **E 07867192 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2066351**

(54) Título: **Anticuerpos humanos que se unen a CXCR4 y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

02.10.2006 US 827851 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2015

(73) Titular/es:

E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US

(72) Inventor/es:

KUHNE, MICHELLE;
BRAMS, PETER;
TANAMACHI, DAWN M.;
KORMAN, ALAN y
CARDARELLI, JOSEPHINE M.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 553 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 humanos que se unen a CXCR4 y usos de los mismos

Antecedentes

Las quimiocinas son una familia de aproximadamente 50 proteínas pequeñas que modulan la circulación celular y la angiogénesis, y también desempeñan una función significativa en el microambiente tumoral (Vicari, A.P. y Caux, C. (2002) Cytokine Growth Factor Rev. 13:143-154). Dependiendo de su estructura, las quimiocinas se clasifican, como quimiocinas C-C (que contienen un motivo cisteína-cisteína) o quimiocinas C-X-C (que contienen un motivo cisteína-X-cisteína). Los receptores que se unen a tales quimiocinas se clasifican, por lo tanto, como miembros de la familia CCR o de la familia CXCR, respectivamente. Un miembro de la familia CXCR es CXCR4, un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G que se expresa predominantemente en linfocitos y que activa la quimiotaxia. CXCR4 se une a la quimiocina CXCL12 (SDF-1).

CXCR4 desempeña una función en la embriogénesis, homeostasis e inflamación. Estudios con ratones modificados para ser deficientes en CXCR4 o SDF-1 involucran a la vía de CXCR4/SDF-1 en la vascularización de los órganos, así como en los sistemas inmunitario y hematopoyético (Tachibana, K. et al. (1998) Nature 393:591-594). Además, se ha mostrado que CXCR4 funciona como un correceptor para cepas aisladas del VIH-1 linfotrófico T (Feng, Y. et al. (1996) Science 272:872-877). También se ha mostrado que CXCR4 se expresa en una amplia variedad de tipos de células cancerosas. Adicionalmente, se ha mostrado que la vía de CXCR4/SDF-1 está involucrada en la estimulación del proceso metastásico en muchos neoplasmas diferentes (Murphy, P.M. (2001) N. Engl. J. Med. 345:833-835). Por ejemplo, se ha mostrado que CXCR4 y SDF-1 median en metástasis específicas de órgano creando un gradiente quimiotáctico entre el sitio tumoral primario y el sitio metastásico (Muller, A. et al. (2001) Nature 410:50-56; Murakami, T. et al. (2002) Cancer Res. 62:7328-7334; Hanahan, D. et al. (2003) Cancer Res. 63:3005-3008).

Vaday G.G. et al, (2004) Clinical Cancer Research, vol. 10, p. 5630-5639 desvelan que dos anticuerpos anti-CXCR4 Ab124 y Ab125 tienen las siguientes propiedades: se unen a células de cáncer de próstata; inhiben la unión de DF1 a CXCR4 sobre células de cáncer de próstata; producen una reducción significativa en el flujo de calcio; inhiben la quimiotaxia de células de cáncer de próstata; e inhiben la invasión de células de cáncer de próstata.

Sumario

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a CXCR4 humano y que presentan numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen la capacidad de unirse a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular, la capacidad de inhibir la unión de SDF-1 a CXCR4 humano, la capacidad de inhibir el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4, la capacidad de inhibir la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4, la capacidad de inhibir la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana (HuVEC), la capacidad de inducir apoptosis en células que expresan CXCR4, la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales *in vitro,* la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales *in vivo,* la capacidad de inhibir la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$ y/o la capacidad de aumentar el tiempo de supervivencia de un sujeto que padece un tumor $CXCR4^+$.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular. En una realización, el anticuerpo también inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 humano, preferentemente con una CE_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, o 30 nM o menos, o 15 nM o menos, o 10 nM o menos, o 5 nM o menos, o 3 nM o menos (por ejemplo, una CE_{50} para la inhibición de 28,60 nM o menos, o 12,51 nM o menos, o 2,256 nM o menos). En otra realización, el anticuerpo se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular, pero no inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo también inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 humano, preferentemente con una CE_{50} para la inhibición de 3 nM o menos, o 2 nM o menos, o 1 nM o menos, o 0,9 nM o menos, o 0,8 nM o menos, o 0,7 nM o menos, o 0,6 nM o menos, o 0,5 nM o menos, o 0,4 nM o menos (por ejemplo, 0,9046 nM o menos, 0,5684 o menos, o 0,3219 nM o menos). En otras realizaciones más, el anticuerpo también inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 humano, preferentemente con una CE_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, o 30 nM o menos, o 20 nM o menos, o 15 nM o menos (por ejemplo, 18,99 nM o menos, o 12,44 nM o menos). En otras realizaciones más, el anticuerpo también inhibe la formación de tubos capilares por HuVEC, induce la apoptosis de células que expresan CXCR4, inhibe la proliferación de células tumorales *in vitro,* inhibe la proliferación de células tumorales o induce la apoptosis de células tumorales *in vivo*, inhibe la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$ y/o aumenta el tiempo de supervivencia de un sujeto que padece un tumor $CXCR4^+$.

Preferentemente, el anticuerpo se une a CXCR4 humano con afinidad alta, tal como una K_D de 1×10^{-7} M o menos o con una K_D de 5×10^{-8} M o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos de

longitud completa (es decir, que comprenden regiones variables y constantes). Además, los anticuerpos de la presente divulgación se dirigen preferentemente contra CXCR-4 humano de longitud completa expresado en su conformación nativa sobre una célula huésped o en una membrana artificial.

En un aspecto preferido, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en la que el anticuerpo:

(a) se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular;
(b) inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 humano;
(c) inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 humano;
(d) inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 humano; y
(e) inhibe la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana.

Incluso más preferentemente, el anticuerpo induce también la apoptosis de células que expresan CXCR4 humano y/o inhibe el crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ y/o induce la apoptosis de células tumorales *in vivo.*

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo compite de forma cruzada por la unión a CXCR4 con un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 25 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 29; o
(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 26 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 30; o
(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 27 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31; o
(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 28 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 32.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación 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 se deriva de, un gen V_H 3-48 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4 humano. En otras realizaciones, la presente divulgación 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 se deriva de, un gen V_K L15 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4 humano. En otras realizaciones más, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de, o se deriva de, un gen V_H 3-48 humano y una región variable de la cadena ligera que es el producto de, o se deriva de, un gen V_K L15 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4 humano.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o 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 las 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 SEC ID Nº: 9-12 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 21-24 y modificaciones conservativas de las mismas; y
(c) el anticuerpo se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular.

En realizaciones preferidas, este anticuerpo también tiene una o más de las siguientes características: inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4, inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4, inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR-4; inhibe la formación de tubos capilares por HuVEC; induce la apoptosis en células que expresan CXCR4 *(in vitro* y/o *in vivo),* inhibe el crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ *in vitro* y/o *in vivo,* y/o inhibe la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$.

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 SEC ID Nº: 5-8 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 17-20 y modificaciones conservativas 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

en las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nº: 1-4 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 13-16 y modificaciones conservativas de las mismas.

Una combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 1;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 5;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 9;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 13;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 17; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 21.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 2;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 6;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 10;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 14;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 18; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 22.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 3;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 7;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 11;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 15;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 19; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 23.

Otra combinación preferida comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 4;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 8;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 12;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 16;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 20; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 24.

Otros anticuerpos preferidos de la presente divulgación, o porciones de unión a antígeno de los mismos, comprenden: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 25-28 y 41-44; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 29-32 y 45-48; en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4.

Una combinación preferida comprende: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 25 o 41; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 29 o 45.

Otra combinación preferida comprende: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 26 o 42: y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 30 o 46.

Otra combinación preferida comprende: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 27 o 43; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31 o 47.

Otra combinación preferida comprende: (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 28 o 44; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 32 o 48.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que compiten por la unión a CXCR4 con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, de un isotipo IgG1 o IgG4. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'$_2$, o anticuerpos monocatenarios.

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

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

También quedan englobadas por la presente divulgación moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente divulgación, así como vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células huésped que comprenden tales vectores de expresión. También se proporcionan métodos de preparación de anticuerpos anti-CXCR4 que utilizan las células huésped que comprenden tales vectores de expresión y pueden incluir las etapas de (i) expresar el anticuerpo en la célula huésped y (ii) aislar el anticuerpo de la célula huésped.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a métodos para modular la actividad de CXCR4 en una célula, en el que las células se ponen en contacto con un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente divulgación. Las células pueden ponerse en contacto *in vitro* cultivando las células con el anticuerpo, o las células pueden ponerse en contacto *in vivo* administrando el anticuerpo a un sujeto. En una realización preferida, las células son células tumorales que expresan CXCR4 y el método produce la inhibición del crecimiento de células tumorales y/o la inhibición de la metástasis de las células tumorales. En otra realización, las células son linfocitos T que expresan CXCR4 y el método produce la inhibición de la entrada del VIH en las células. En otra realización más, las células son linfocitos en un trastorno inflamatorio y los métodos producen la inhibición de la inflamación. En una realización más, las células están involucradas en la vascularización y el método produce la modulación de la angiogénesis.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para estimular la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente divulgación de forma que se estimule la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica. El método puede comprender además recoger las células madre $CD34^+$ de la sangre periférica tal como su uso en trasplante autólogo de células madre.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben ser considerados como limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 25) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano F7. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 1), CDR2 (SEC ID Nº: 5) y CDR3 (SEC ID Nº: 9) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 29) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano F7. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 13), CDR2 (SEC ID Nº: 17) y CDR3 (SEC ID Nº: 21) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 34) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 26) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano F9. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 2), CDR2 (SEC ID Nº: 6) y CDR3 (SEC ID Nº: 10) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 38) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 30) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano F9. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 14), CDR2 (SEC ID Nº: 18) y CDR3 (SEC ID Nº: 22) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 35) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 27) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano D1. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 3), CDR2 (SEC ID Nº: 7) y CDR3 (SEC ID Nº: 11) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 39) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº:

31) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano D1. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 15), CDR2 (SEC ID Nº: 19) y CDR3 (SEC ID Nº: 23) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 36) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 28) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano E2. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 4), CDR2 (SEC ID Nº: 8) y CDR3 (SEC ID Nº: 12) están delineadas y las derivaciones V, D y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 40) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 32) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano E2. Las regiones CDR1 (SEC ID Nº: 16), CDR2 (SEC ID Nº: 20) y CDR3 (SEC ID Nº: 24) están delineadas y las derivaciones V y J de la línea germinal están indicadas.

La Figura 5A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de F7 (SEC ID Nº: 25) y F7GL (SEC ID Nº: 41) con la secuencia de aminoácidos V_H 3-48 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 49) (línea germinal JH6b divulgada como SEC ID Nº: 52).

La Figura 5B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera de F7 (SEC ID Nº: 29) y F7GL (SEC ID Nº: 45) con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 50) (línea germinal JK1 divulgada como SEC ID Nº: 53).

La Figura 6A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de F9 (SEC ID Nº: 26) y F9GL (SEC ID Nº: 42) con la secuencia de aminoácidos V_H 3-48 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 49) (línea germinal JH6b divulgada como SEC ID Nº: 52).

La Figura 6B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera de F9 (SEC ID Nº: 30) y F9GL (SEC ID Nº: 46) con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 50) (línea germinal JK1 divulgada como SEC ID Nº: 53).

La Figura 7 A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de D1 (SEC ID Nº: 27) y D1GL (SEC ID Nº: 43) con la secuencia de aminoácidos V_H 3-48 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 49) (línea germinal JH6b divulgada como SEC ID Nº: 52).

La Figura 7B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera de D1 (SEC ID Nº: 31) y D1GL (SEC ID Nº: 47) con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 50) (línea germinal JK1 divulgada como SEC ID Nº: 53).

La Figura 8A muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de E2 (SEC ID Nº: 28) y E2GL (SEC ID Nº: 44) con la secuencia de aminoácidos V_H 3-48 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 49) (línea germinal JH6b divulgada como SEC ID Nº: 52).

La Figura 8B muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de E2 (SEC ID Nº: 32) y E2GL (SEC ID Nº: 48) con la secuencia de aminoácidos V_k L15 de la línea germinal humana (SEC ID Nº: 50) (línea germinal JK1 divulgada como SEC ID Nº: 53).

La Figura 9 es una gráfica que muestra la unión de anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7, F9, D1 y E2 a células CEM que expresan CXCR4 humano nativo sobre la superficie celular.

La Figura 10 es una gráfica que muestra la competición de los anticuerpos por la unión a células CEM entre el anticuerpo anti-CXCR4 F9 marcado con FITC y un panel de anticuerpos anti-CXCR4 humanos sin marcar.

La Figura 11 es una gráfica que muestra la inhibición de la unión de SDF-1 marcado con ^{125}I a células CEM por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7, F9 y D1.

La Figura 12 es una gráfica que muestra la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 en células CEM por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7, F9 y D1.

La Figura 13 es una gráfica que muestra la inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células CEM por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7 y F9.

La Figura 14 es una gráfica que muestra la inhibición de la proliferación de células Ramos tumorales *in vitro* por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7, F9 y E2.

Las Figuras 15A-C son gráficas que muestran la inhibición de la proliferación de células Ramos tumorales *in vivo* en un modelo de tumor subcutáneo por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7 y F9. La Figura 15A muestra la curva del volumen medio de crecimiento tumoral; la Figura 15B muestra la mediana de la curva del volumen de crecimiento tumoral; la Figura 15C muestra la mediana del % de cambio de peso.

La Figura 16 es una gráfica que muestra el % de supervivencia de ratones tratados con el anticuerpo anti-CXCR4 humano F9 en un modelo de células Ramos tumorales sistémicas.

Descripción detallada de la presente divulgación

La presente divulgación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación se derivan de secuencias de la línea germinal de la cadena pesada y ligera particulares y/o comprenden características estructurales particulares, tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La presente divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos de preparación de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la presente divulgación. La presente divulgación también se refiere a métodos para usar los anticuerpos, tal como para detectar CXCR4, además de para modular la actividad de CXCR4 en enfermedades o trastornos asociados a la expresión de CXCR4 o que involucran a la vía de CXCR4/SDF-1, tales como cánceres,

metástasis tumoral, infección por el VIH, inflamación y angiogénesis. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona métodos para usar los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación para tratar cáncer, por ejemplo, para tratar un cáncer tal como de mama, de ovario, de próstata, de pulmón de células no pequeñas, pancreático, de tiroides, melanoma, nasofaríngeo, de células renales, linfoma, neuroblastoma, glioblastoma, rabdomiosarcoma, colorrectal, renal, osteosarcoma, leucemia linfoblástica aguda o leucemia mieloide aguda. Adicionalmente, la presente divulgación proporciona métodos para usar los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación para inhibir la metástasis tumoral.

Con el fin de que la presente divulgación pueda comprenderse más fácilmente, se definen, en primer lugar, ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término “CXCR4” incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para CXCR4 pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con CXCR4 de especies distintas de humanas. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para CXCR4 humano pueden ser completamente específicos para CXCR4 humano y pueden no presentar reactividad cruzada con otras especies o de otro tipo. La expresión “CXCR4 humano” se refiere a la secuencia de CXCR4 humano, tal como la secuencia de aminoácidos completa de CXCR4 humano que tiene el número de acceso a Genbank P61073 (SEC ID Nº:51). CXCR4 también se conoce en la materia como, por ejemplo, LESTR, fusina o CD184. La secuencia de CXCR4 humano puede diferenciarse de la secuencia de CXCR4 humano de SEC ID Nº: 51 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas, y el CXCR4 tiene sustancialmente la misma función biológica que el CXCR4 humano de SEC ID Nº: 51. Por ejemplo, una función biológica de CXCR4 humano es tener un epítope en el dominio extracelular de CXCR4 al que se une específicamente un anticuerpo de la presente divulgación, o la función biológica de CXCR4 humano es la unión a la quimiocina o la participación en el proceso metastásico.

Una secuencia particular de CXCR4 humano será, generalmente, al menos el 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos al CXCR4 humano de SEC ID Nº: 51 y contiene residuos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como humana cuando se compara con secuencias de aminoácidos de CXCR4 de otras especies (por ejemplo, murinas). En ciertos casos, un CXCR4 humano puede ser al menos el 95 %, o incluso al menos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos al CXCR4 de SEC ID Nº: 51. En ciertas realizaciones, una secuencia de CXCR4 humano no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos de CXCR4 de SEC ID Nº: 51. En ciertas realizaciones, el CXCR4 humano no puede presentar más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de CXCR4 de SEC ID Nº: 51. El porcentaje de identidad puede determinarse como se describe en el presente documento.

El término “SDF-1” se refiere al factor 1 derivado de células del estroma, que es un ligando de CXCR4. El término “SDF-1” engloba las isoformas diferentes de SDF-1, tales como SDF-1α y SDF-1β. La secuencia de aminoácidos de SDF-1α humano tiene el número de acceso a Genbank NP_954637. La secuencia de aminoácidos de SDF-1β humano tiene el número de acceso a Genbank NP_000600. El SDF-1 humano se describe también en la patente de EE.UU. Nº 5.756.084. El SDF-1 también se conoce como CXCL12. La secuencia de aminoácidos de SDF-1 humano puede diferenciarse de la de SDF-1 de NP_954637 o NP_000600, como se describe en el presente documento para CXCR4.

La expresión “respuesta inmunitaria” se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o por el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y el complemento) que produce el daño selectivo a, destrucción de o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una “vía de transducción de señales” se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señales que desempeñan una función en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se usa en el presente documento, la expresión “receptor de la superficie celular” incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de una señal tal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un “receptor de la superficie celular” de la presente divulgación es el receptor CXCR4.

El término “anticuerpo”, como se hace referencia en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “porción de unión a antígeno”) o cadenas simples del mismo. Un “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende 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 comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende 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 comprende un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo

amino a extremo carboxi en el siguiente orden: 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 en la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

La expresión “porción de unión a 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 (por ejemplo, CXCR4). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, 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., 3ª ed., 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1; (v) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un anticuerpo de un solo brazo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) Nature 34L544-546), que consiste de un dominio V_H; (vii) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR); y (viii) un Nanobody, una región variable de la cadena pesada que contiene un dominio variable simple y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que permite que éstos se preparen como una cadena de proteína simple en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv)); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios también pretenden estar englobados dentro de la expresión “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando métodos convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia, y los fragmentos se criban para utilidad del mismo modo que con los anticuerpos intactos.

Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo aislado” pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CXCR4 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CXCR4). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CXCR4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas CXCR4 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

La expresión “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo con una única composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad y afinidad de unión por un epítope particular.

La expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones estructurales como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de la región estructural humanas.

La expresión “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión “anticuerpo recombinante humano”, 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 de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de éstos (se describe con más detalle a continuación); (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma; (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique cortar y empalmar secuencias de genes de inmunoglobulina humanas con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones estructurales y regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales

anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, si se emplea un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo)* y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, puede que no existan de forma natural en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo.*

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, 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 intercambiablemente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" tiene por objeto hacer referencia a anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de la región estructural humanas. Pueden hacerse modificaciones adicionales de las regiones estructurales dentro de las secuencias de la región estructural humanas.

La expresión "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a CXCR4 humano" pretende referirse a un anticuerpo que se une a CXCR4 humano (y posiblemente a CXCR4 de una o más especies no humanas), pero no se une sustancialmente a proteínas no CXCR4. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une específicamente al CXCR4 humano de SEC ID Nº: 51 o una variante del mismo. Preferentemente, el anticuerpo se une a CXCR4 humano con una K_D de 1×10^{-7} o menos, más preferentemente 5×10^{-8} o menos, más preferentemente 3×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente 5×10^{-9} M o menos.

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

El término "K_{as}" o "K_a", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "K_{dis}" o "K_d", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "K_D", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constate de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d con respecto a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos pueden determinarse usando métodos muy establecidos en la materia. Un método preferido para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de pasmones superficiales, preferentemente usando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

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

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

Se describen con mayor detalle varios aspectos de la presente divulgación en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-CXCR4

Los anticuerpos de la presente divulgación se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular. Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 con alta afinidad, por ejemplo

con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menos. Los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación presentan preferentemente una o más de las siguientes características:

(a) se unen a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular;
(b) inhiben la unión de SDF-1 a CXCR4;
(c) inhiben el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4;
(d) inhiben la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4;
(e) inhiben la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana.
(f) se unen a CXCR4 humano con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menos;
(g) inducen la apoptosis en células que expresan CXCR4;
(h) inhiben la proliferación de células tumorales *in vitro;*
(i) inhiben la proliferación de células tumorales y/o inducen la apoptosis de células tumorales *in vivo*;
(j) inhiben la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$; y/o
(k) aumentan el tiempo de supervivencia de un sujeto que padece un tumor $CXCR4^+$.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 humano nativo sobre una superficie celular, pero no inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 y no inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 y no inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4. En otras realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 humano nativo sobre una superficie celular e inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 e inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4, pero no inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4. En otras realizaciones más, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 humano nativo sobre una superficie celular e inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 e inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 e inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4. En otras realizaciones más, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 humano nativo sobre una superficie celular, inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4, inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4, inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 e inhibe la formación de tubos capilares por HuVEC.

Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 humano con una K_D de 5 x 10^{-8} M o menos, se une a CXCR4 humano con una K_D de 2 x 10^{-8} M o menos, se une a CXCR4 humano con una K_D de 5 x 10^{-9} M o menos, se une a CXCR4 humano con una K_D de 4 x 10^{-9} M o menos, se une a CXCR4 humano con una K_D 3 x 10^{-9} M o menos, o se une a CXCR4 humano con una K_D de 2 x 10^{-9} M o menos.

Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 humano con una CE_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, más preferentemente 30 nM o menos, o 15 nM o menos, o 10 nM o menos, o 5 nM o menos, o 3 nM o menos (por ejemplo, una CE_{50} para la inhibición de 28,60 nM o menos, o 12,51 nM o menos, o 2,256 nM o menos).

Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 humano con una CE_{50} para la inhibición de 3 nM o menos, más preferentemente 2 nM o menos, o 1 nM o menos, o 0,9 nM o menos, o 0,8 nM o menos, o 0,7 nM o menos, o 0,6 nM o menos, o 0,5 nM o menos, o 0,4 nM o menos (por ejemplo, 0,9046 nM o menos, 0,5684 o menos, o 0,3219 nM o menos).

Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 humano con una CE_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, más preferentemente 30 nM o menos, o 20 nM o menos, o 15 nM o menos (por ejemplo, 18,99 nM o menos, o 12,44 o menos).

Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular son conocidos en la materia, que incluyen, por ejemplo, análisis de citometría de flujo usando una línea celular que expresa naturalmente CXCR4 nativo o que se ha transfectado para expresar CXCR4 nativo. Se describen ensayos adecuados en detalle en los ejemplos. Una línea celular preferida que expresa CXCR4 nativo es la línea de linfocitos T CEM. Ensayos adecuados para evaluar la inhibición de la unión de SDF-1, la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1, la inhibición de la migración celular inducida por SDF-1, la inhibición de la formación de tubos capilares por HuVEC, la inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4 *in vitro* y/o *in vivo,* la inhibición del crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ *in vitro* y/o *in vivo* y/o la inhibición de la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$ también se describen en detalle en los ejemplos. También puede determinarse la afinidad de unión de los anticuerpos por métodos estándar, tales como por el análisis de Scatchard.

Anticuerpos monoclonales F7, F9, D1 y E2

Los anticuerpos preferidos de la presente divulgación son los anticuerpos monoclonales humanos F7, F9, D1 y E2, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 25, 26, 27 y 28, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_L de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 29, 30, 31 y 32, respectivamente. Adicionalmente, se crearon formas alternativas de F7, F9, D1 y E2, en las que ciertos residuos de la región estructural se substituyeron con un residuo de la línea germinal, y se denominan en la presente F7GL, F9GL, D1GL y E2GL. Las secuencias de

aminoácidos V_H de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en SEC ID Nº: 41, 42, 43 y 44, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_L de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en SEC ID Nº: 45, 46, 47 y 48, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a CXCR4, las secuencias V_H y V_L pueden "'mezclarse y combinarse" para crear otras moléculas de unión a anti-CXCR4 de la presente divulgación. Puede probarse la unión a CXCR4 de tales anticuerpos "mezclados y combinados" usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo con células CEM). Preferentemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y combinan, una secuencia V_H de una combinación V_H / V_L particular se sustituye por una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, se sustituye preferentemente una secuencia V_L de una combinación V_H / V_L por una secuencia V_L estructuralmente similar.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 25-28 y 41-44; y
(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº; 29-32 y 45-48;

en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4, preferentemente a CXCR4 humano.
Las combinaciones preferidas de cadena pesada y ligera incluyen:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 25 o 41, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 29 o 45; o
(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 26 o 42, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 30 o 46; o
(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 27 o 43, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 31 o 47; o
(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 28 o 44, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 32 o 48.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y de la cadena ligera de F7, F9, D1 o E2, o sus combinaciones. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 1-4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 5-8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 9-12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 13-16, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 17-20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 21-24, respectivamente. Las regiones CDR son delineadas usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH Nº 91-3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CXCR4 y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona fundamentalmente por las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y CDR1, CDR2 y CDR3 de V_k pueden "mezclarse y combinarse" (es decir, las CDR de anticuerpos diferentes pueden mezclarse y combinarse, 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-CXCR4 de la presente divulgación. La unión a CXCR4 de tales anticuerpos "mezclados y combinados" puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo, ELISA y análisis Biacore®). Preferentemente, cuando se mezclan y combinan secuencias CDR de V_H, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular se sustituye por una secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Asimismo, cuando se mezclan y combinan secuencias CDR de V_k, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_k particular se sustituye preferentemente por una secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Será fácilmente evidente para un experto en la materia que pueden crearse secuencias V_H y V_L novedosas sustituyendo una o más secuencias de las regiones CDR de V_H y/o V_L por secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en el presente documento para los anticuerpos monoclonales los anticuerpos F7, F9, D1 y E2.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o 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 SEC ID Nº: 1-4;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 5-8;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 9-12;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 13-16;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 17-20; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 21-24;
en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4, preferentemente a CXCR4 humano.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 1;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 5;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 9;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 13;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 17; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 21.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 2;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 6;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 10;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 14;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 18; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 22.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 3;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 7;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 11;
(d) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 15;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 19; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 23.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 4;
(b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 8;
(c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende SEC ID Nº: 12;
(d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 16;
(e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 20; y
(f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende SEC ID Nº: 24.

Se conoce bien en la materia 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 relacionado, y que pueden generarse predeciblemente múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión basándose en una secuencia CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka et al, British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando únicamente 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 recombinantes de glicoproteína-2 epitelial (EGP-2) usando únicamente la secuencia CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo parental murino MOC-31 anti-EGP-2); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos anti-integrina $a_{\upsilon}\beta_3$ humanizados usando una CDR3 del dominio variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino anti-integrina $a_{\upsilon}\beta_3$ LM609, en el que cada anticuerpo integrante comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de unirse al mismo epítope que el anticuerpo murino parental con afinidades tan altas como el anticuerpo parental murino o mayores); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162 (1994) (que divulga que el dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión de 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) contra el ADN placentario humano en la cadena pesada de un Fab anti-toxoide tetánico sustituyendo de este modo la CDR3 de la cadena

pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 por sí solo confería especificad de unión); y Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996) (que describe estudios de injerto en los que la transferencia de únicamente CDR3 de la cadena pesada de un Fab poliespecífico parental LNA3 a una cadena pesada de un Fab de un anticuerpo IgG monoespecífico p313 de unión al toxoide tetánico era suficiente para retener la especificidad de unión del Fab parental); Berezov et al., BIAjournal 8:Scientific Review 8 (2001) (que describe miméticos de péptidos basados en la CDR3 de un anticuerpo monoclonal anti-HER2; Igarashi et al., J. Biochem (Tokio) 117:452-7 (1995) (que describe un polipéptido sintético de 12 aminoácidos que se corresponde con el dominio CDR3 de un anticuerpo anti-fosfatidilserina); Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10 (1998) (que muestra que un único péptido derivado del dominio CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo anti-virus sincitial respiratorio (VSR) fue capaz de neutralizar el virus *in vitro*); Levi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8 (1993) (que describe un péptido basado en el dominio CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo murino anti-VIH); Polymenis y Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329 (1994) (que describe posibilitar la unión de un scFv mediante el injerto de la región CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo de unión a ADN-Z); y Xu y Davis, Immunity 13:37-45 (2000) (que describe que la diversidad en la CDR3 de la cadena pesada es suficiente para permitir que moléculas IgM, por lo demás idénticas, distingan entre varios antígenos de hapteno y de proteína). Véanse también las patentes de EE.UU. Nº 6.951.646; 6.914.128; 6.090.382; 6.818.216; 6.156.313; 6.827.925; 5.833.943; 5.762.905 y 5.760.185, que describen anticuerpos patentados definidos por un único dominio CDR.

Por consiguiente, la presente divulgación 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 CXCR4. Dentro de ciertos aspectos, la presente divulgación 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 CXCR4. Dentro de algunas realizaciones, tales anticuerpos 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 con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítope; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del anticuerpo no humano parental correspondiente.

Dentro de otros aspectos, la presente divulgación 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 de un animal no humano, en el que el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CXCR4. Dentro de otros aspectos, la presente divulgación 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 de un animal no humano, en el que el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CXCR4 y en el que el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano sustituye a un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión a CXCR4 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a CXCR4. Dentro de algunas realizaciones, tales anticuerpos 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 con; (b) retienen las características funcionales; (c) se unen al mismo epítope; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del primer anticuerpo humano parental correspondiente.

Anticuerpos que tienen secuencias de la línea germinal particulares

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación comprende una región variable de la cadena pesada de un gen particular de inmunoglobulina de la cadena pesada de la línea germinal y/o una región variable de la cadena ligera de un gen particular de inmunoglobulina de la cadena ligera de la línea germinal.

Por ejemplo, en una realización preferida, la presente divulgación 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 se deriva de, un gen V_H 3-48 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4. En otra realización preferida, la presente divulgación 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 se deriva de, un gen V_k L15 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4. En una realización preferida más, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de, o se deriva de, un gen V_H 3-48 humano y comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de, o se deriva de, un gen V_k Ll5 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a CXCR4, preferentemente a CXCR4 humano. Tales anticuerpos también pueden poseer una o más de las características funcionales descritas en detalle anteriormente, tales como la unión a CXCR4 nativo expresado sobre una superficie celular, la inhibición de la unión de SDF-1 a CXCR4, la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4, la inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4, la inhibición de la formación de tubos capilares por HuVEC, la inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4 *in vitro* y/o *in vivo,* la inhibición del crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ *in vitro* y/o *in vivo,* y/o la inhibición de la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$.

Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 3-48 y V_K L15, respectivamente, son los anticuerpos F7, F9, D1 y E2.

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 "se deriva de" una secuencia particular de la línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribar una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana expresados en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más próxima en secuencia (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas que existen de forma natural o a la introducción intencional de una mutación dirigida a sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado es normalmente al menos el 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como que es humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otra especie (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos el 95 %, o incluso al menos el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la línea germinal humana no presentará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano no puede presentar más de 5, o incluso más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos homólogos

En otra realización más, un anticuerpo de la presente 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 el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o 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 el 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEC ID Nº: 25-28 y 41-44;
(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEC ID Nº: 29-32 y 45-48;
(c) el anticuerpo se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes propiedades funcionales: (i) se une a CXCR4 humano con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos; (ii) inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4; (iii) inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4; (iv) inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4; (v) inhibe la formación de tubos capilares por HuVEC; (vi) induce la apoptosis en células que expresan CXCR4 *in vitro* y/o *in vivo;* (vii) inhibe el crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ *in vitro* y/o *in vivo;* y/o (viii) inhibe la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$.

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

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_L pueden ser el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Puede obtenerse un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen alta homología (es decir, el 80 % o superior) a las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican SEC ID Nº: 25-32 o 41-48, seguido de probar el anticuerpo alterado codificado para la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

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 = nº

de posiciones idénticas/ nº total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan ser introducidos para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse 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 pesos de residuos 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 puede determinarse 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 GCG (disponible en http://vvww.gcg.com), usando tanto una matriz Blossum 62 como una matriz PAM250, y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de las proteínas de la presente divulgación pueden usarse adicionalmente como “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda por comparación con bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de la divulgación. Puede utilizarse Gapped BLAST para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17);3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, son útiles los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente 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 el que una o más de estas secuencias CDR comprende secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento (por ejemplo, F7, F9, D1 o E2), o modificaciones conservativas de las mismas, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación. Se entiende en la materia que pueden hacerse ciertas modificaciones conservativas de las secuencias que no eliminan la unión a antígeno. Véanse, por ejemplo, Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8 (que describe el análisis mutacional en el dominio CDR3 de la cadena pesada de anticuerpos específicos para la *Salmonella*); de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41 (que describe estudios de mutaciones en anticuerpos anti-UA1); Komissarov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870 (que muestra que mutaciones en la parte intermedia de HCDR3 condujeron a tanto una afinidad suprimida como reducida); Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12 (que describe que un único cambio de aminoácido en la región CDR3 suprimió la actividad de unión); Kelley y O’Connell (1993) Biochem. 32:6862-35 (que describe la contribución de residuos Tyr en la unión a antígeno); Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. j_0:341 -6 (describe el efecto de la hidrofobicidad en la unión) y Beers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43 (que describe mutantes de aminoácidos de HCDR3). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o 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:

(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 SEC ID Nº: 9-12 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 21-44 y modificaciones conservativas de las mismas; y
(c) el anticuerpo se une a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede poseer una o más de las siguientes propiedades funcionales: (i) se une a CXCR4 humano con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos; (ii) inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4; (iii) inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4; (iv) inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4; (v) inhibe la formación de tubos capilares por HuVEC; (vi) induce la apoptosis en células que expresan CXCR4 *in vitro* y/o *in vivo;* (vii) inhibe el crecimiento de células tumorales $CXCR4^+$ *in vitro* y/o *in vivo*; y/o (viii) inhibe la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$,

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 SEC ID Nº: 5-8 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 17-20 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 1-4 y modificaciones conservativas 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 SEC ID Nº: 13-16 y modificaciones conservativas de las mismas.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “modificaciones de secuencia conservativas” pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de la presente divulgación por técnicas estándar conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la materia familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la presente divulgación pueden sustituirse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales, y el anticuerpo alterado puede probarse para función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Anticuerpos que se unen al mismo epítope que los anticuerpos anti-CXCR4

En otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítope sobre CXCR4 humano que cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 de la presente divulgación (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir de forma cruzada por la unión a CXCR4 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal F7 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestran en SEC ID Nº: 25 y 29, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal F9 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestran en SEC ID Nº: 26 y 30, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal D1 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestran en SEC ID Nº: 27 y 31, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal E2 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestran en SEC ID Nº: 28 y 32, respectivamente).

Tales anticuerpos de competición cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad de competir de forma cruzada con F7, F9, D1 o E2 en ensayos estándar de unión a CXCR4. Por ejemplo, puede usarse citometría de flujo con células CEM para demostrar la competición cruzada con los anticuerpos de la presente divulgación, en el que el anticuerpo de referencia está marcado con FITC y se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba de inhibir la unión del anticuerpo de referencia marcado con FITC a células CEM. La capacidad de un anticuerpo de prueba de inhibir la unión de, por ejemplo, F7, F9, D1 o E2, a CXCR4 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con F7, F9, D1 o E2 por la unión a CXCR4 humano y, por lo tanto, se une al mismo epítope de CXCR4 humano que F7, F9, D1 o E2. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítope sobre CXCR4 que F7, F9, D1 o E2 es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en los ejemplos.

Anticuerpos manipulados y modificados

Un anticuerpo de la presente divulgación puede prepararse adicionalmente usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L divulgadas en el presente documento como material de partida para manipular un anticuerpo modificado, pudiendo dicho anticuerpo modificado tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede manipularse modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir. V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones estructurales. Adicionalmente o alternativamente, un anticuerpo puede manipularse modificando de residuos dentro de la(s) región (regiones) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función (funciones) efectora(s) del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, puede usarse injerto de CDR para manipular regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las

interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que existen de forma natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico que existe de forma natural injertado en secuencias de la región estructural de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, por ejemplo, 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; patente de EE.UU. Nº 5.225.539 de Winter, y patentes de EE.UU. Nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.)

Por consiguiente, otra realización de la presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o 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 SEC ID Nº: 1-4, SEC ID Nº: 5-8 y SEC ID Nº: 9-12, 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 SEC ID Nº: 13-16, SEC ID Nº: 17-20 y SEC ID Nº: 21-24, respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de anticuerpos monoclonales F7, F9, D1 o E2, pero pueden contener secuencias de la región estructural diferentes de estos anticuerpos.

Tales secuencias de la región estructural pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, pueden encontrarse secuencias de ADN de la línea germinal para genes de las regiones variables de la cadena pesada y ligera humanas en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana “VBase” (disponible de Internet en wmv.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), además de en Kabat, E, A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH Nº 91-3242; Tomlinson, I. M., et al (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of VH 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 VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas pueden encontrarse en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles en los números de acceso a Genbank que se indican a continuación: 1-69 (NG_0010109, 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 la cadena pesada de la línea germinal encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles en los números de acceso a Genbank que se indican a continuación: 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). Otra fuente adicional de secuencias de la cadena pesada y ligera de la línea germinal humana es la base de datos de genes de inmunoglobulina humana disponibles de IMGT (http://imgt.cines.fr).

Se comparan secuencias de proteínas del anticuerpo con una base de datos de secuencias de proteínas recopiladas usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencias llamado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402), que es muy conocido para aquellos expertos en la materia. BLAST es un algoritmo heurístico en el que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de la base de datos es probable que contenga pares de segmentos de alto puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyas puntuaciones no pueden mejorarse por extensión o recorte se conocen como un *hit* (acierto). Resumidamente, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbasel/list2.php) se traducen y se retiene la región entre y que incluye las regiones estructurales de FR1 a FR3. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud promedio de 98 residuos. Se descartan las secuencias duplicadas que son coincidencias exactas en toda la longitud de la proteína. Una búsqueda BLAST para proteínas usando el programa blastp con parámetros estándar por defecto, excepto el filtro de baja complejidad, que está desconectado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra los 5 aciertos principales que dan coincidencias de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en los seis marcos y el marco sin codones de parada en el segmento coincidente de la secuencia de la base de datos se considera el posible acierto. Esto se confirma a su vez usando el programa tblastx de BLAST, que traduce la secuencia del anticuerpo en los 6 marcos y compara aquellas traducciones con las secuencias de nucleótidos VBASE traducidas dinámicamente en los seis marcos. Pueden consultarse similarmente a VBASE otras bases de datos de secuencias de la línea germinal humana, tales como la disponible de IMGT (http://imgt.cines.fr), como se describió anteriormente.

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 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 de la secuencia coincidente.

Secuencias de la región estructural preferidas para uso en los anticuerpos de la presente divulgación son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de la región estructural usadas por anticuerpos seleccionados de la presente divulgación, por ejemplo, similares a las secuencias de la región estructural V_H 3-48 (SEC ID Nº: 49)

y/o la secuencia de la región estructural V_K L15 (SEC ID Nº: 50) usadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la presente divulgación. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_k pueden injertarse en regiones estructurales que tengan una secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que se deriva la secuencia de la región estructural, o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones estructurales para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 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 mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones V_H y/o V_K de CDR1, CDR2 y/o CDR3 para así mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. Pueden realizarse mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la(s) mutación (mutaciones) y el efecto sobre la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los ejemplos. Se introducen modificaciones preferentemente conservativas (como se trató anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero preferentemente son sustituciones. Además, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 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_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 1-4 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 1-4; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 5-8 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 5-8; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 9-12 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 9-12; (d) una región CDR1 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 13-16 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 13-16; (e) una región CDR2 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 17-20 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 17-20; y (f) una región CDR3 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 21-24 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEC ID Nº: 21-24.

Los anticuerpos manipulados de la presente divulgación incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a residuos de la región estructural dentro de V_H y/o V_K, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, tales modificaciones de la región estructural se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en “retromutar” uno o más residuos de la región estructural a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de la región estructural que se diferencian de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias de la región estructural del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo.

Por ejemplo, para la región V_H de F7, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 6 y 25. Pueden retromutarse una, dos o las tres posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos o tres de las siguientes sustituciones: Q1E, Q6E y A25S. Una forma modificada preferida de la región V_H de F7 es la V_H de F7GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 5A y en SEC ID Nº: 41), que tiene las siguientes sustituciones de la región estructural: Q1E y Q6E.

Además, para la región V_K de F7, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 3 y 84. Pueden retromutarse una, dos o las tres posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos o tres de las siguientes sustituciones; A1D, R3Q y V84A. Una forma modificada preferida de la región V_H de F7 es la V_K de F7GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 5B y en SEC ID Nº: 45), que tiene las siguientes sustituciones de la región estructural: A1D y R3Q.

Además, para la región V_H de F9, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 6 y 25. Pueden retromutarse una, dos o las tres posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos o tres de las siguientes sustituciones: Q1E, Q6E y A25S. Una forma modificada preferida de la región V_H de F9 es la V_H de F9GL (cuya secuencia de

aminoácidos se muestra en la Figura 6A y en SEC ID Nº: 42), que tiene las siguientes sustituciones de la región estructural: Q1E y Q6E.

Además, para la región V_K de F9, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 3, 4 y 60. Pueden retromutarse una, dos, tres o las cuatro posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos, tres o cuatro de las siguientes sustituciones: E1D, V3Q, L4M y P60S. Una forma modificada preferida de la región V_K de F9 es la V_K de F9GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 6B y en SEC ID Nº: 46), que tiene las siguientes sustituciones de la región estructural: E1D, V3Q y L4M.

Además, para la región V_H de D1, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 6, 25 y 76. Pueden retromutarse una, dos o las tres posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos o tres de las siguientes sustituciones: Q6E, A25S y R76K. Una forma modificada preferida de la región V_H de D1 es la V_H de D1GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 7A y en SEC ID Nº: 43), que posee la siguiente sustitución de la región estructural: Q6E.

Además, para la región V_K de D1, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 3, 4, 45 y 46. Pueden retromutarse una, dos, tres, cuatro o las cinco posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos, tres, cuatro o las cinco de las siguientes sustituciones: V1D, W3Q, V4M, E45K y L46S. Una forma modificada preferida de la región V_K de D1 es la V_K de D1GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 7B y en SEC ID Nº: 47), que tiene las siguientes sustituciones de la región estructural: V1D, W3Q y V4M.

Además, para la región V_H de E2, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 6 y 25. Pueden retromutarse una o las dos posiciones a las secuencias de la línea germinal si se realiza una o dos de las siguientes sustituciones: Q6E y A25S. Una forma modificada preferida de la región V_H de E2 es la V_H de E2GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 8A y en SEC ID Nº: 44), que posee la siguiente sustitución de la región estructural: Q6E.

Además, para la región V_K de E2, las siguientes posiciones de aminoácidos de la región estructural (usando el sistema de numeración de Kabat) se diferencian de la línea germinal: 1, 3 y 4. Pueden retromutarse una, dos o las tres posiciones a las secuencias de la línea germinal haciendo una, dos o tres de las siguientes sustituciones: E1D, V3Q y L4M. Una forma modificada preferida de la región V_K de E2 es la V_K de E2GL (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 8B y en SEC ID Nº: 48), que posee las siguientes sustituciones de la región estructural: E1D, V3Q y L4M.

Otro tipo de modificación de la región estructural implica mutar uno o más residuos dentro de la región estructural, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopes de los linfocitos T para así reducir la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina “desinmunización” y se describe con mayor detalle en la publicación de Patente de EE.UU. Nº 20030153043 de Carr et al.

Además o alternativamente a las modificaciones hechas dentro de las regiones estructurales o CDR, los anticuerpos de la presente divulgación pueden manipularse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación del complemento, unión a receptores Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la presente divulgación puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden unirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumente o se reduzca. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. Nº 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas, o para aumentar o reducir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para acortar la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región bisagra de la interfase de los dominios CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de tal modo que el anticuerpo tenga una unión a la proteína estafilocócica A (SpA) alterada con relación a la unión del dominio bisagra de Fc nativo a la SpA. Este enfoque se describe más detalladamente en la patente de EE.UU. Nº 6.165.745 de Ward et al.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo

puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítope de unión a un 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. Nº 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

En otras realizaciones adicionales, la región Fc se altera sustituyendo al menos un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente para alterar la(s) función (funciones) efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden sustituirse por un residuo de aminoácido diferente, de tal modo que se el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe más detalladamente en las patentes de EE.UU. Nº 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden sustituirse con un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga la unión de C1q alterada, y/o se reduzca o anule la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe más detalladamente en la patente de EE.UU. Nº 6.194.551 de Idusogie et al.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de los aminoácidos 231 y 239 se alteran para así alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

En otro ejemplo adicional, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) 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 adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión sobre IgG1 humana para FcγRl, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Se mostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se mostró que los siguientes mutantes de combinación mejoraban la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización adicional, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones con hidratos de carbono pueden realizarse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que producen la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de las regiones estructurales de la región variable para así eliminar la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque tal se describe más detalladamente en las patentes de EE.UU. Nº: 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al.

Adicionalmente o alternativamente, puede producirse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras de GlcNac de bisección aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones con hidratos de carbono pueden realizarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la materia células con maquinaria de glicosilación alterada, y pueden usarse como células huésped en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la presente divulgación para así producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa-(1,6)-fucosiltransferasa), de tal modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Se crearon las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 $FUT8^{+/-}$ por la alteración dirigida como diana del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reposición (véase la publicación de patente de EE.UU. Nº 20040110704 de Yamane et al. y Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describen una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal modo que los anticuerpos expresados en una línea celular tal presentan hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai et al. también describen líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática por la adición de fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo, la línea de células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, las células Lec13, con capacidad reducida de unir fucosa a hidratos de carbono enlazados a Asn(297), lo que produjo también la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). También pueden producirse anticuerpos con un perfil de glicosilación

modificado en huevos de pollo, como se describe en la publicación PCT Nº WO2006/089231. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna.* Se divulgan métodos para la producción de anticuerpos en un sistema vegetal en la solicitud de patente de EE.UU. correspondiente de Alston & Bird LLP, expediente de agente Nº 040989/314911, presentado el 11 de agosto de 2006. La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describen líneas celulares manipuladas para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas presenten estructuras GlcNac de bisección aumentadas, que produce elevada actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden escindirse usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla por la presente divulgación es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado reactivo de éster o de aldehído de PEG, en condiciones en las que se consigue unir uno o más grupos PEG al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante 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, el término “polietilenglicol” pretende englobar cualquiera de las formas de PEG que han sido usadas para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10)- o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Se conocen métodos para pegilar proteínas en la materia y pueden aplicarse a los anticuerpos de la presente divulgación. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 de Nishimura et al. y EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos

La presente invención no se limita a anticuerpos tradicionales y puede ponerse en práctica mediante el uso de fragmentos de anticuerpos. Como se detalla a continuación, se han desarrollado recientemente una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y de miméticos de anticuerpos, y son ampliamente conocidas en la materia. Aunque varias de estas tecnologías, tales como anticuerpos de dominio, Nanobodies y UniBodies, hacen uso de fragmentos de, u otras modificaciones a, estructuras de anticuerpos tradicionales, también existen tecnologías alternativas, tales como Affibodies, DARPins, anticalinas, avímeros y Versabodies, que emplean estructuras de unión que, aunque imitan la unión del anticuerpo tradicional, se generan de y funcionan mediante distintos mecanismos.

Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas extensas y sumamente funcionales de dAb de VH y VL completamente humanos (más de 10 billones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y usa estas bibliotecas para seleccionar dAb que son específicos para dianas terapéuticas. A diferencia de los muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas bacterianos, de levadura y de células de mamífero. Pueden obtenerse más detalles de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos por referencia a las patentes de EE.UU. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; de EE. UU. Nº de serie 2004/0110941; solicitud de patente europea Nº 1433846 y patentes europeas 0368684 y 0616640; W005/035572, W004/101790, W004/081026, W004/058821, W004/003019 y W003/002609.

Los Nanobodies son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada que existen de forma natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable simple (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante que el dominio VHH clonado y aislado sea un polipéptido perfectamente estable que albergue la capacidad total de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanobodies tienen una alta homología con los dominios VH de anticuerpos humanos y pueden humanizarse adicionalmente sin pérdida alguna de actividad. Es importante que los Nanobodies tengan un potencial inmunogénico bajo, que se ha confirmado en estudios en primates con cabezas de serie de Nanobodies.

Los Nanobodies combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los Nanobodies muestran alta especificidad por la diana, alta afinidad por su diana y baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña pueden inhibir enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras de los receptores. Además, los Nanobodies son extremadamente estables, pueden administrarse por medios distintos de por inyección (véase, por ejemplo, el documento WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los Nanobodies incluyen el reconocimiento de epítopes poco frecuentes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, la unión a cavidades o sitios activos de dianas proteínicas con afinidad y selectividad alta debido a su flexibilidad tridimensional única en formato de fármaco, la adaptación de su semivida, y la facilidad y velocidad de descubrimiento de

fármacos.

Los Nanobodies son codificados por genes simples y se producen eficazmente en casi todos los huéspedes procariotas y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, el documento US 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, el documento 6.838.254). El proceso de producción puede llevarse a cabo a gran escala y se han producido cantidades de multikilogramos de Nanobodies. Debido a que los Nanobodies presentan una estabilidad superior en comparación con la de los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una disolución lista para uso con larga estabilidad en almacén.

El método Nanoclone (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanobodies contra una diana deseada, basándose en la selección automática de alto rendimiento de linfocitos B y podría usarse en el contexto de la presente invención.

Los UniBodies son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos, sin embargo, ésta se basa en la eliminación de la región bisagra de anticuerpos IgG4. La deleción de la región bisagra produce una molécula que tiene esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También se conoce bien que los anticuerpos IgG4 son inertes y, así, no interaccionan con el sistema inmunitario, que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las que no se desea una respuesta inmunitaria, y esta ventaja se extiende a los UniBodies. Por ejemplo, los UniBodies pueden desempeñar la función de inhibir o silenciar, pero no de destruir, las células a las que se unen. Adicionalmente, la unión de los UniBodies a células cancerosas no estimula su proliferación. Además, debido a que los UniBodies tienen la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar mejor distribución en tumores sólidos más grandes con eficacia posiblemente ventajosa. Los UniBodies se eliminan del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 completos y son capaces de unirse con una afinidad similar por sus antígenos como los anticuerpos completos. Pueden obtenerse más detalles de los Unibodies por referencia a la patente WO2007/059782.

Las moléculas de Affibodies representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de residuo de proteína de 58 aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio del haz de tres hélices se ha usado como andamiaje para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, de las que pueden seleccionarse variantes de Affibodies que se dirigen a las moléculas deseadas usando tecnología de expresión en fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55). La estructura simple y robusta de las moléculas de Affibodies, en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones de receptores (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28- CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). Pueden obtenerse más detalles de los Affibodies y métodos de producción de los mismos por referencia a la patente de EE.UU. Nº 5831012.

Los Affibodies marcados también pueden ser útiles en aplicaciones de obtención de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

Las DARPins (proteínas de repetición de anquirina diseñadas) son un ejemplo de una tecnología de DRP (proteína de repetición diseñada) de miméticos de anticuerpos que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos no de anticuerpos. Las proteínas de repetición, tales como las proteínas de repetición ricas en anquirina y leucina, son moléculas de unión ubicuas que existen, al contrario que los anticuerpos, intra- y extracelularmente. Su arquitectura modular única caracteriza unidades estructurales repetitivas (repeticiones) que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión a dianas variables y modulares. Basándose en esta modularidad, pueden generarse bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño consensuado de repeticiones autocompatibles que muestran residuos superficiales variables y su ensamblaje aleatorio en dominios de repetición.

Las DARPins pueden producirse en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos muy altos y pertenecen a las proteínas más estables conocidas. Se han seleccionado DARPins de alta afinidad, sumamente específicas, para una gran variedad de proteínas diana, que incluyen receptores humanos, citocinas, cinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Pueden obtenerse DARPins que tienen afinidades en el intervalo de nanomolar a picomolar de un solo dígito.

Las DARPins se han usado en una gran variedad de aplicaciones, que incluyen ELISA, ELISA tipo sándwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chip, purificación por afinidad o transferencia Western. Se demostró también que las DARPins eran altamente activas en el compartimento

intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP). Las DARPins se usaron además para inhibir la entrada viral con CI50 en el intervalo de pM. Las DARPins no son solo ideales para bloquear interacciones proteína-proteína, sino que también inhiben enzimas. Se han inhibido satisfactoriamente proteasas, cinasas y transportadores, en la mayoría de los casos un modo de inhibición alostérico. Enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y relaciones de tumor con respecto a sangre muy favorables hacen que las DARPins sean muy adecuadas para diagnósticos *in vivo* o enfoques terapéuticos.

Puede encontrarse información adicional referentes a las DARPins y otras tecnologías de DRP en la publicación de patente de EE.UU. Nº 2004/0132028 y la publicación de solitud de patente internacional Nº WO 02/20565.

Las anticalinas son una tecnología de miméticos de anticuerpos adicional, sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de peso molecular bajo que se expresan natural y abundantemente en tejidos y fluidos corporales humanos. Las lipocalinas han evolucionado para realizar varias funciones *in vivo* asociadas con el transporte y almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril β altamente conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada a un sitio de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula representan la variación en la especificidad de unión entre lipocalinas individuales.

Aunque la estructura global de los bucles hipervariables soportada por una región estructural de hoja β conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas se diferencian considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, estar compuestas de una sola cadena polipeptídica de 160-180 aminoácidos que es ligeramente mayor que un dominio simple de inmunoglobulina.

Las lipocalinas se clonan y sus bucles se someten a modificaciones por ingeniería genética para crear anticalinas. Se han generado bibliotecas de anticalinas estructuralmente diversas y la expresión de las anticalinas permite la selección y el cribado de la función de unión, seguido por la expresión y producción de proteína soluble para el análisis adicional en sistemas procariotas o eucariotas. Los estudios han demostrado satisfactoriamente que pueden desarrollarse anticalinas que son específicas para prácticamente cualquier proteína diana humana, pueden aislarse y pueden obtenerse afinidades de unión en el intervalo nanomolar o en uno mayor.

También pueden presentarse las anticalinas como proteínas de doble diana, llamadas duocalinas.

Una duocalina se une a dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica fácilmente producida usando procesos de fabricación estándar mientras que se retiene la especificidad y afinidad por la diana independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de dianas múltiples mediante una única molécula es particularmente ventajosa en enfermedades conocidas por implicar más de un único factor causante. Además, los formatos de unión bi- o multivalentes, tales como duocalinas, tienen un potencial significativo para elegir como diana moléculas de la superficie celular en enfermedades, mediar en efectos agonistas en sistemas de transducción de señales o inducir efectos de internalización potenciados mediante la unión y agrupación de receptores de la superficie celular. Además, la alta estabilidad intrínseca de las duocalinas es comparable a la de las anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación flexible y potencial de administración para las duocalinas.

Puede encontrarse información adicional referente a las anticalinas en la patente de EE.UU. Nº 7.250.297 y la publicación de solicitud de patente internacional WO 99/16873.

Otra tecnología de miméticos de anticuerpos útil en el contexto de la presente invención son los avímeros. Los avímeros se han desarrollado a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos por barajado de exones *in vitro y* expresión en fagos, generando proteínas de dominios múltiples con propiedades de unión e inhibidoras. Se ha mostrado que el enlace de dominios de unión independientes múltiples crea avidez y produce afinidad y especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión convencionales con un solo epítope. Otras posibles ventajas incluyen la producción simple y eficaz de moléculas específicas de dianas múltiples en *Escherichia coli*, estabilidad térmica y resistencia frente a proteasas mejoradas. Se han obtenido avímeros con afinidades inferiores a nanomolares contra varias dianas.

Puede encontrarse información adicional referente a los avímeros en las publicaciones de solicitud de patente Nº 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

Los Versabodies son otra tecnología de miméticos de anticuerpos que podría usarse en el contexto de la presente divulgación. Los Versabodies son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con >15 % de cisternas, que forma un andamiaje con alta densidad de disulfuros, sustituyendo al núcleo hidrófobo que tienen las proteínas típicas. La sustitución de un gran número de aminoácidos hidrófobos, que comprenden el núcleo hidrófobo, con un pequeño número de disulfuros produce una proteína que es más pequeña, más hidrófila (menor agregación y unión no específica), más

resistente a proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopes de linfocitos T, debido a que los residuos que más contribuyen a la presentación del MHC son hidrófobos. Se sabe bien que estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad y se espera que juntas provoquen una gran disminución en la inmunogenicidad.

La inspiración de los Versabodies procede de los biofármacos inyectables naturales producidos por sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe que presentan una inmunogenicidad inesperadamente baja. Al partir de familias de proteínas naturales seleccionadas, se minimizan, mediante el diseño y cribado, el tamaño, la hidrofobia, el procesamiento proteolítico de antígenos y la densidad de epítopes a niveles muy por debajo del promedio para proteínas inyectables naturales.

Dada la estructura de los Versabodies, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, diversos mecanismos de semivida, módulos que eligen como diana tejidos y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versabodies se fabrican en *E. coli* con altos rendimientos y, debido a su hidrofilia y pequeño tamaño, los Versabodies son altamente solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los Versabodies son excepcionalmente termoestables (pueden hervirse) y ofrecen semivida prolongada.

Puede encontrarse información adicional referente a los Versabodies en la publicación de solitud de patente de EE.UU. Nº 2007/0191272.

La descripción detallada de las tecnologías de fragmentos de anticuerpos y de miméticos de anticuerpos proporcionada anteriormente no pretende ser una lista exhaustiva de todas las tecnologías que podrían usarse en el contexto de la presente divulgación. Por ejemplo, y tampoco de modo limitante, varias tecnologías adicionales, que incluyen tecnologías alternativas basadas en polipéptidos, tales como fusiones de regiones determinantes de la complementariedad como se describe brevemente en Qui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007), así como tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como las tecnologías de aptámeros de ARN descritas en las patentes de EE.UU. Nº 5.789.157, 5,864.026, 5.712.375, 5.763.566, 6.013.443, 6.376.474, 6.613.526, 6.114.120, 6.261.774 y 6.387.620, podrían usarse en el contexto de la presente divulgación.

Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden caracterizarse adicionalmente por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-CXCR4. Pueden usarse diversos ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden contener uno o más sitios de glicosilación en tanto la región variable de la cadena ligera como pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede producir un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a la unión a antígeno alterada (Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 4L673-702; 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 glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación en la región variable puede probarse usando un ensayo Glycoblot, que escinde el anticuerpo para producir un Fab y, posteriormente, prueba la glicosilación usando un ensayo que mide la oxidación con peryodato y la formación de bases de Schiff. Alternativamente, la glicosilación de la región variable puede probarse usando cromatografía iónica Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido individual de sacáridos. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CXCR4 que no contenga glicosilación en la región variable. Esto puede lograrse o bien seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable, o bien mutando residuos dentro del motivo de glicosilación usando técnicas estándar muy conocidas en la materia.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente divulgación no contienen sitios de isomería de la asparagina. Un efecto de desamidación o de ácido isoaspártico puede producirse en secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o de ácido isoaspártico produce la creación de ácido isoaspártico que reduce la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura curvada a partir del extremo carboxi de una cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico puede medirse usando un ensayo de isocuanta, que usa una HPLC en fase inversa para probar ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un único punto isoeléctrico (pI), pero, generalmente, los anticuerpos entrarán dentro del intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 entra normalmente dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 entra normalmente dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que quede fuera de este intervalo. Aunque, generalmente, se desconocen los efectos, existe la especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener cierto despliegue e inestabilidad en condiciones *in vivo.* El punto isoeléctrico puede probarse usando un ensayo de isoelectroenfoque capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar un enfoque láser para aumentar la exactitud (Janini *et al* (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67). En

algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CXCR4 que contenga un valor pl que entre en el intervalo normal. Esto puede conseguirse tanto seleccionando anticuerpos con un pl en el intervalo normal como mutando residuos superficiales cargados usando técnicas estándar bien conocidas en la materia.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Una mayor estabilidad térmica indica mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52). T_{M1} indica la temperatura del despliegue inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura del despliegue completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que T_{M1} de un anticuerpo de la presente divulgación sea mayor de 60 ºC, preferentemente mayor de 65 ºC, incluso más preferentemente mayor de 70 ºC. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse usando dicroísmo circular (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-CXCR4 puede medirse usando electroforesis capilar (CE) y EM-MALDI, como es bien entendido en la materia (Alexander AJ y Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínimos. La agregación puede dar lugar a que se desencadene una respuesta inmunitaria no deseada y/o a propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables 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. La agregación puede medirse por varias técnicas bien conocidas en la materia, que incluyen cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y dispersión de la luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Métodos de manipulación de anticuerpos

Como se ha tratado anteriormente, los anticuerpos anti-CXCR4 que tienen secuencias V_H y V_K divulgadas en el presente documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-CXCR4 modificando las secuencias V_H y/o V_K, o la(s) región (regiones) constantes unida(s) a las mismas. Así, en otro aspecto de la presente divulgación, las características estructurales de un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación, por ejemplo, F7, F9, D1 o E2, se usan para crear anticuerpos anti-CXCR4 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la presente divulgación, tal como la unión a CXCR4 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de F7, F9, D1 o E2, o mutaciones de las mismas, pueden combinarse recombinantemente con regiones estructurales conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-CXCR4 recombinantemente modificados adicionales de la presente divulgación, como se ha tratado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las aquellas en la sección anterior. El material de partida para el método de manipulación es 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. Para crear el anticuerpo manipulado, en realidad, no es necesario preparar (es decir, expresar como 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. Más bien se usa la información contenida en la(s) secuencia(s) como material de partida para crear secuencia(s) de “segunda generación” derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es), y posteriormente se prepara(n) la(s) secuencia(s) de “segunda generación” y se expresa(n) como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CXCR4 que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 1-4, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 5-8 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 9- 12; y/o (ii) una secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 13-16, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 17-20 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 21-24;
(b) alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera de anticuerpo para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y
(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Pueden usarse técnicas estándar de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo alterada(s) es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-CXCR4 descritos en el presente documento, propiedades funcionales que incluyen, pero no se limitan a:

(i) la unión a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular;
(ii) la inhibición de la unión de SDF-1 a CXCR4;
(iii) la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4;
(iv) la inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4;
(v) la inhibición de la formación de tubos capilares por HuVEC;
(vi) la unión a CXCR4 humano con una K_D de $10x10^{-7}$ M o menos;
(vii) la inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4;
(viii) la inhibición de la proliferación de células tumorales *in vitro*;
(ix) la inhibición de la proliferación de células tumorales y/o la inducción de la apoptosis de células tumorales *in vivo;*
(x) la inhibición de la metástasis de células tumorales $CXCR4^+$; y/o
(xi) el incremento del tiempo de supervivencia de un sujeto que padece un tumor $CXCR4^{+.}$

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos estándar disponibles en la materia y/o descritos en el presente documento, tales como aquellos brevemente explicados en los ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión, ensayos funcionales).

En ciertas realizaciones de los métodos de manipulación de los anticuerpos de la presente divulgación, pueden introducirse mutaciones aleatoria o selectivamente a lo largo de la totalidad o en parte de una secuencia codificante de anticuerpos anti-CXCR4, y los anticuerpos anti-CXCR4 modificados resultantes pueden cribarse para actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. Se han descrito en la materia métodos de mutación. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para la creación y el cribado de mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblaje sintético por ligación, o una combinación de éstos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al. describen métodos de uso de métodos de cribado por ordenador para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la presente divulgación

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la presente divulgación. 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 está “aislado” o “se presenta sustancialmente puro” cuando se ha purificado de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, que incluyen tratamiento con álcali/SDS, formación de bandas en CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la materia. Véase F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humana, como se describe adicionalmente a continuación) pueden obtenerse ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma por amplificación estándar por PCR o técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de expresión en fagos), el ácido nucleico que codifica tales anticuerpos puede obtenerse de la biblioteca de genes.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la presente divulgación son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales F7, F9, D1 y E2. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 33-36, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias V_L de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEC ID Nº: 37-40, respectivamente.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se enlaza operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión “enlazado operativamente”, como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN se mantienen en marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de la cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se conocen en la materia las secuencias de genes de la región constante de la cadena pesada humana (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH Nº 91-3242) y los

fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse por amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena presada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar enlazado operativamente a otra molécula de ADN que codifique únicamente la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región de V_L puede convertirse en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de la cadena ligera de Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Se conocen en la materia las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH Nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse por amplificación estándar por PCR. En realizaciones preferidas, la región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly4\text{-}Ser)_3$, de tal modo que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el conector flexible (véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferly et al., (1990) Nature 348:552-554).

Producción de anticuerpos monoclonales de la presente divulgación

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente divulgación pueden producirse por varias técnicas, que incluyen la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, 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, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para la preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la materia protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen componentes de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. Puede obtenerse ADN que codifica la cadena pesada y la ligera de las inmunoglobulinas a partir del hibridoma no humano de interés y manipularse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, pueden enlazarse regiones variables murinas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en una región estructural humana usando métodos conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.225.539 de Winter y las patentes de EE.UU. Nº 5.530.101; 5.585.089: 5.693.762 y 6.180.370 de Queen).

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CXCR4 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones denominados en el presente documento HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y se denominan de manera colectiva en el presente documento “ratones de Ig humana “.

El HuMAb Mouse® (Medarex® Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de las cadenas pesadas (μ y γ) y ligera κ de inmunoglobulina humana sin reordenar, junto con mutaciones dirigidas que desactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas pesada y ligera humanas introducidos sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGκ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), arriba; 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 uso de HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J 12:821-830; Tuaillon 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, adicionalmente, las patentes de EE.UU. Nº 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. Nº 5.545.807 de Surani et al.; las publicaciones PCT Nº 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 Nº WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, pueden producirse anticuerpos humanos de la presente divulgación usando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que lleva un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Este ratón se denomina en el presente documento un "KM Mouse®" y se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Más aún, en la materia están disponibles sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y que pueden usarse para producir anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, en la materia están disponibles sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para producir anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden usarse ratones que llevan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana como un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito en la materia vacas que llevan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humanos (por ejemplo, Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894 y la solicitud PCT Nº WO 2002/092812) y pueden usarse para producir los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación usando métodos de expresión en fagos para el cribado de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de expresión en fagos para el aislamiento de anticuerpos humanos están establecidos en la materia. Véanse, por ejemplo: las patentes de EE.UU. Nº 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; las patentes de EE.UU. Nº 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; las patentes de EE.UU. Nº 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y las patentes de los EE.UU. Nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal modo que puede generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

En una realización preferida particular, se preparan anticuerpos anti-CXCR4 humanos usando una combinación de ratón de Ig humana y de técnicas de expresión en fagos, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.794.132 de Buechler et al. Más específicamente, el método implica primero producir una respuesta de anticuerpos anti-CXCR4 en un ratón de Ig humana (tal como un ratón HuMab o ratón KM como se ha descrito anteriormente) inmunizando el ratón con un antígeno CXCR4, seguida de aislamiento de ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpos humanos a partir de células linfáticas de ratón e introducción de estos ácidos nucleicos en un vector de expresión (por ejemplo, fago) para proporcionar una biblioteca de conjuntos de expresión. Así, cada miembro de la biblioteca comprende un ácido nucleico que codifica una cadena de anticuerpo humano y cada cadena de anticuerpo es expresada por el conjunto de expresión. A continuación, la biblioteca se criba con un antígeno CXCR4 para aislar los miembros de la biblioteca que se unen específicamente a CXCR4. Las inserciones de ácido nucleico de los miembros seleccionados de la biblioteca se aíslan a continuación y se secuencian por métodos estándar para determinar las secuencias variables de la cadena ligera y pesada de los ligantes CXCR4 seleccionados. Las regiones variables pueden convertirse en cadenas de anticuerpo de longitud completa por técnicas estándar de ADN recombinante, tales como clonación de las regiones variables en un vector de expresión que lleva las regiones constantes de la cadena pesada y ligera humanas, de tal modo que la región VH se enlaza operativamente a la región CH y la región VL se enlaza operativamente a la región CL. Véase el Ejemplo 1 para una descripción adicional de la preparación de anticuerpos anti-CXCR4 humanos usando este sistema combinado de ratón transgénico/expresión en fagos.

Inmunización de ratones de Ig humana

Cuando se usan ratones de Ig humana para producir anticuerpos humanos de la presente divulgación, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CXCR4 y/o CXCR4 recombinante, o células que expresan CXCR4, o una proteína de fusión de CXCR4, 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 una edad de 6-16 semanas tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o recombinante (5-50 μg) de antígeno CXCR4 para inmunizar los ratones de Ig humana intraperitonealmente. Lo más preferentemente, el inmunogén usado para producir los anticuerpos de la presente divulgación comprende CXCR4 humano en su conformación nativa dentro de

una membrana, ejemplos no limitantes de esto incluyen células transfectadas para expresar CXCR4 sobre su superficie celular, células que expresan nativamente CXCR4 (por ejemplo, células CEM) y membranas artificiales (por ejemplo, liposomas) en las que se ha incorporado CXCR4, tales como proteoliposomas magnéticos (MPL) que incorporan CXCR4 (descrito adicionalmente en el Ejemplo 1).

Se describen procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para CXCR4 en el Ejemplo 1 más adelante. La experiencia acumulada con diferentes antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, también se ha encontrado que son eficaces otros adyuvantes distintos de los de Freund. Adicionalmente, se ha encontrado que en ausencia de adyuvante las células completas son sumamente inmunogénicas. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por extracciones de sangre retroorbitales. El plasma puede cribarse por ELISA (como se describe a continuación), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CXCR4 pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse intravenosamente con antígeno 3 días antes de ser sacrificados y de extirparles el bazo. Se espera que pueda ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Se inmunizan, normalmente, entre 6 y 24 ratones para cada antígeno. Normalmente se usan tanto las cepas HCo7 como HCo12. Adicionalmente, pueden cruzarse juntos transgenes HCo7 y HCo12 en un único ratón que tiene dos transgenes de la cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativamente o adicionalmente, puede usarse la cepa de KM Mouse®, como se describe en el Ejemplo 1.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a un sexto del número de células de mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) no secretantes con 50 % de PEG. Alternativamente, la suspensión de células simples de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados puede fusionarse usando un método de electrofusión basado en un campo eléctrico, usando un electroporador de fusión de células en cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). Las células se siembran a aproximadamente 2 x 10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de 2 semanas en medio selectivo que contiene 20 % de suero de clon fetal, 18 % de medio acondicionado “653”, 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente 2 semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que HAT se reemplaza con HT. Los pocillos individuales pueden cribarse posteriormente por ELISA para anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Una vez que se produce el crecimiento extenso de hibridomas, normalmente puede observarse el medio después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden colocarse nuevamente en placas, cribarse de nuevo y, si son todavía positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse a continuación *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrifugación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La disolución tampón puede intercambiarse por PBS, y la concentración puede determinarse por DO280 usando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 ºC.

Generación de transfectomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden producirse en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la materia (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, pueden obtenerse ADN que codifican las cadenas ligera y pesada parciales o de longitud completa, por técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de tal modo que los genes estén enlazados operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión “enlazado operativamente” pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de tal modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función prevista de regulación de la

transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera del isotipo deseado de tal modo que el segmento V_H se enlace operativamente al (a los) segmento(s) C_H dentro del vector, y el segmento V_K se enlace operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal se enlace en marco al 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 no de inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press. San Diego, CA (1990)). Será apreciado por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados del citomegalovirus (CMV), virus 40 de los simios (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β-globina. Más aún, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias del promotor SV40 temprano y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T humanos tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador de selección 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 de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células dhfr- huésped con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de 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 por técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” pretenden englobar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la presente divulgación en tanto células huésped procariotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente células huésped de mamífero, es la más preferida debido a que es más probable que tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, se ensamblen que las células procariotas y secreten un anticuerpo plegado adecuadamente e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión procariota de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la presente divulgación incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células $dhfr^-$ CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador DHFR de selección, por ejemplo, como se describió en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. En particular, para uso con células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en los documentos WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338.841 (de Bebbington). Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen 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 en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden probarse para la unión a CXCR4, por ejemplo, por métodos estándar de citometría de flujo. Debido a que los anticuerpos de la presente divulgación reconocen preferentemente CXCR4 en su conformación nativa dentro de una membrana, la prueba para la unión a CXCR4 se hace preferentemente con un ensayo (por ejemplo, citometría de flujo) que utiliza un reactivo que expresa la conformación nativa de CXCR4. Ejemplos no limitantes de reactivos que expresan la conformación nativa de CXCR4 que pueden usarse en los ensayos de unión incluyen células que expresan naturalmente CXCR4 (por ejemplo, células CEM), células que han sido transfectadas para expresar CXCR4 (por ejemplo, células R1610 transfectadas con un vector de expresión de CXCR4) y liposomas en los que se ha incorporado CXCR4 (por ejemplo, proteoliposomas magnéticos que incorporan CXCR4), cada uno de los cuales se describe más detalladamente en los ejemplos. Brevemente, para el ensayo de citometría de flujo, las células que expresan CXCR4 se incuban con el anticuerpo de prueba, se lavan, se incuban con un reactivo secundario marcado capaz de unirse al anticuerpo de prueba, se lavan de nuevo y se someten a análisis para detectar la unión del reactivo secundario a las células (por ejemplo, usando un equipo FACS). Preferentemente, los ratones que desarrollen los títulos más altos al evaluarlos con citometría de flujo se usarán para fusiones o para la selección adicional de anticuerpos (por ejemplo, por cribado de expresión en fagos de bibliotecas de anticuerpos creadas a partir de linfocitos B de ratón).

También puede usarse un ensayo de citometría de flujo como se ha descrito anteriormente para cribar hibridomas que muestran reactividad positiva con un inmunogén CXCR4. Los hibridomas que expresan anticuerpos que se unen con alta avidez a CXCR4 se subclonan y se caracterizan posteriormente. Puede elegirse un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células parentales (por citometría de flujo), para producir un banco de células de 5-10 viales conservadas a -140 ºC y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-CXCR4, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrifugación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La disolución tampón puede intercambiarse por PBS, y la concentración puede determinarse por DO280 usando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 ºC.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 seleccionados se unen a epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Pueden realizarse estudios de competición usando anticuerpos monoclonales sin marcar y anticuerpos monoclonales biotinilados usando un ensayo ELISA de células completas en el que placas ELISA se recubren con células que expresan CXCR4 y se examina la capacidad del anticuerpo sin marcar de competir con el anticuerpo biotinilado por la unión a las células que expresan CXCR4. La unión de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipo usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con 1 μg/ml de anti-inmunoglobulina humana durante la noche a 4 ºC. Después del bloqueo con 1 % de BSA, 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 una a dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar luego con tanto IgG1 humana como sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgM humana. Las placas se revelan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Pueden probarse adicionalmente IgG anti-CXCR4 humanas para la reactividad con el antígeno CXCR4 por transferencia Western. En resumen, puede prepararse CXCR4 y someterse 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 10 % de suero de ternera fetal y se sondan con los anticuerpos monoclonales que van a probarse. La unión de IgG humana puede detectarse usando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

La especificidad de unión de un anticuerpo de la presente divulgación también puede determinarse monitorizando la unión del anticuerpo a células que expresan CXCR4, por ejemplo, por citometría de flujo. Normalmente, una línea celular, tal como una línea celular CHO, puede transfectarse con un vector de expresión que codifica una forma de transmembrana de CXCR4. La proteína transfectada puede comprender una marca, tal como una marca myc, preferentemente en el extremo N, para la detección usando un anticuerpo para la marca. La unión de un anticuerpo de la presente divulgación a CXCR4 puede determinarse incubando las células transfectadas con el anticuerpo y detectando el anticuerpo unido. La unión de un anticuerpo a la marca en la proteína transfectada puede usarse como control positivo.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en el presente documento “inmunoconjugados”. Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan “inmunotoxinas”. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial (por ejemplo, mata) para células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracin-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de éstos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la presente divulgación incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de estás. Está comercialmente disponible un ejemplo de un conjugado de caliqueamicina-anticuerpo (Mylotarg®; American Home Products).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la presente divulgación usando tecnología de conectores disponible en la materia. Ejemplos de tipos de conectores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Puede elegirse un conector que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral, tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para más información sobre tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con 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.

También pueden conjugarse anticuerpos de la presente divulgación con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso en diagnósticos o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo^{131}, indio^{111}, itrio^{90} y lutecio^{177}. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados están establecidos en la materia. Ejemplos de radioinmunoconjugados comercialmente disponibles incluyen Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando anticuerpos de la presente divulgación.

Los conjugados de anticuerpo de la presente divulgación pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada y el resto farmacéutico no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacéutico puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o modificadores de respuestas biológicas, tales como, linfocinas, interleucina-1 (“IL-1”), interleucina-2 (“1L-2”), interleucina-6 (“IL-6”), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (“GM-CSF”), factor estimulante de colonias de granulocitos (“G-CSF”) u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tal resto terapéutico con anticuerpos son bien conocidas, véanse, por ejemplo, Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy” en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery” en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 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. (eds.), págs. 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., (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento del mismo, de la presente divulgación. Un anticuerpo de la presente divulgación, o porciones de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o enlazarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la presente divulgación puede de hecho derivatizarse o enlazarse a más de una molécula funcional distinta para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; también se considera que tales moléculas multiespecíficas están englobadas por la expresión “molécula biespecífica”, como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la presente divulgación, un anticuerpo de la presente divulgación puede enlazarse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o por otro modo) a una o más moléculas de unión distintas, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de tal modo que resulte una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para CXCR4 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítope diana. En una realización particular de la presente divulgación, el segundo epítope diana es un receptor de Fc, por ejemplo, FcγRI humano (CD64) o un receptor de Fcα humano (CD89). Por lo tanto, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan FcγR como FcαR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) y a células diana que expresan CXCR4. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan CXCR4 a células efectoras y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por el receptor de Fc, tales como fagocitosis de las células que expresan CXCR4, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

En una realización de la presente divulgación en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CXCR4. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción anti-factor de intensificación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína superficial implicada en la actividad citotóxica y, por consiguiente, aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La “porción anti-factor de intensificación” puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor y así produce una intensificación del efecto de los determinantes de la unión para el receptor de Fc o el antígeno de la célula diana. La “porción anti-factor de intensificación” puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de la célula diana. Alternativamente, la porción anti-factor de intensificación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la porción anti-factor de intensificación puede unirse a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, por medio de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que produzca una respuesta inmunitaria incrementada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas de la presente divulgación comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción monocatenaria como se describe en la patente de EE.UU. Nº 4.946.778 de Ladner et al.

En una realización, la especificidad de unión para un receptor Fcγ se proporciona por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en el presente documento, la expresión “receptor de IgG” se refiere a cualquiera de los ocho genes de la cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembranario o solubles que están agrupadas en tres clases de receptores de Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fcγ un FcγRI humano de afinidad alta. FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad para IgG monómera (10^8 - 10^9 M^{-1}),

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fcγ preferidos se describen en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de EE.UU. Nº 4.954.617 de Fanger et al.

Estos anticuerpos se unen a un epítope de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fcγ del receptor y, por tanto, su unión no está sustancialmente bloqueada por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos específicos anti-FcγRI útiles en la presente divulgación son mAb22, mAb32, mAb44, mAb62 y mAb197. El hibridoma que produce mAb32 está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Nº de Acceso ATCC HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y la publicación PCT WO 94/10332 de Tempest et al. La línea celular que produce el anticuerpo H22 fue depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con la designación HA022CL1 y tiene el Nº de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas adicionales, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya unión preferentemente no está bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). L expresión “receptor de IgA” pretende incluir el producto génico de un gen α (FcαRI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembranarias sometidas a corte y empalme alternativo de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. FcαRI tiene una afinidad intermedia ($\approx 5 \times 10^7$ M^{-1}) tanto por IgA1 como 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 FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que unen FcαRI fuera del dominio de unión del ligando IgA (Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores de desencadenamiento preferidos para usar en las moléculas biespecíficas de la presente divulgación debido a que (1) se expresan primariamente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles altos (por ejemplo, 5000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median en la presentación de antígenos incrementada de antígenos, que incluyen auto-antígenos, dirigidos a ellos.

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

Las moléculas biespecíficas de la presente divulgación pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-CXCR4, usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y conjugarse luego unas a otras. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, pueden usarse varios agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2- nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véanse, por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686: Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83 y Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). SATA y sulfo-SMCC son agentes de conjugación preferidos, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, éstos pueden conjugarse por enlace sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra está modificada para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden estar codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la presente divulgación puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de la unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de la unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para la preparación de moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 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.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse por, por ejemplo, ensayo inmunosorbente unido a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a enzimas que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de otros varios inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente 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, 1986).

El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como, por ejemplo, el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción (porciones) de unión a antígeno de los mismos, de la presente divulgación, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la presente divulgación. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle a continuación en la sección sobre los usos de los anticuerpos de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, raquídea o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la presente divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, 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 presente divulgación puede también incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito 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 metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de éstos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, arriba, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos en las composiciones, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Adicionalmente, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas deben ser normalmente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que dan un polvo del principio activo junto a cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto a tratar y del modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cada cien por ciento, esta cantidad oscilará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el setenta por ciento, más preferentemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el treinta por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, puede administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la presente divulgación viene dictada por, y es directamente dependiente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosis oscila de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 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 dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Una pauta de tratamiento a modo de ejemplo implica la 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 3 meses o una vez de cada tres a 6 meses. Las pautas de dosificación preferidas para un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez, seguidos por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con especificidades de unión diferentes se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en ocasiones múltiples. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares según indique midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 μg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 μg/ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos presentan la semivida más prolongada, seguidos por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones

profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de lo cual, se puede administrar al paciente una pauta profiláctica.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación 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, afección, estado general de salud e historia médica anterior del paciente que se trata, y factores similares conocidos en el campo médico.

Una “dosis terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación produce preferentemente una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la incapacidad debidos a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores $CXCR4^+$, una “dosis terapéuticamente eficaz” inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 60 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 80 % con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición puede medirse *in vitro* por ensayos conocidos para el médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Una experto habitual en la materia sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como la corpulencia del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una composición de la presente divulgación puede administrarse por una o más vías de administración usando uno o más de varios métodos conocidos en la materia. Como apreciará un experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos de la presente divulgación incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, raquídea u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La expresión “administración parenteral”, como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo de la presente divulgación puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o, generalmente, son conocidos para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la presente divulgación puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las patentes de EE.UU. Nº 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: patente de EE.UU. Nº 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de EE.UU. Nº 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; patente de EE.UU. Nº 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; patente de EE.UU. Nº 4.447.224, que divulga un equipo de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; patente de EE.UU. Nº 4.439.196, que divulga un sistema de

suministro osmótico de fármacos que tiene múltiples compartimientos de cámaras; y patente de EE.UU. Nº 4.475.196, que divulga un sistema de suministro osmótico de fármacos. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos para aquellos expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo.* Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la presente divulgación atraviesan la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.522.811; 5.374,548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a células u órganos específicos, potenciándose así el suministro dirigido del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 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); receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier et al (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L, Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Usos y métodos

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente divulgación tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y el tratamiento de trastornos mediados por CXCR4. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo,* o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar varios trastornos. Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por o modulados por la actividad de CXCR4 o que implican a la vía de CXCR4/SDF-1. Cuando los anticuerpos para CXCR4 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la presente divulgación a CXCR4, los anticuerpos de la presente divulgación pueden usarse para detectar específicamente la expresión de CXCR4 sobre la superficie celular y, además, pueden usarse para purificar CXCR4 por purificación por inmunoafinidad.

Vías de administración adecuadas de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, e inmunoconjugados) de la presente divulgación *in vivo* e *in vitro* son muy conocidas en la materia y pueden ser seleccionadas por un experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto, y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-CXCR4 humanos de la presente divulgación pueden co-administrarse con uno o más agentes terapéuticos diferentes, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar enlazado al agente (con un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente al agente, o puede co-administrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino-sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida-hidroxiurea que, por sí solos, son eficaces solamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra intravenosamente como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra intravenosamente como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos anti-CXCR4 humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente divulgación junto con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes antineoplásicos que operan por mecanismos diferentes que dan un efecto citotóxico a las células tumorales humanas. Tal co-administración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las haría no reactivas con el anticuerpo.

Las células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente divulgación también pueden usarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos espontáneos y otras células que llevan receptores de IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse como una suspensión de células en una disolución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8-10^9, pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la

célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CXCR4, y para efectuar la muerte celular por, por ejemplo, fagocitosis. También pueden variar las vías de administración.

La terapia con células efectoras específicas de diana puede realizarse en asociación con otras técnicas para la eliminación de células elegidas como diana. Por ejemplo, puede usarse terapia antitumoral usando las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente divulgación y/o células efectoras provistas de estas composiciones en asociación con quimioterapia. Adicionalmente, puede usarse inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas al rechazo de células tumorales. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-CXCR4 enlazados a anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 en asociación con agentes de unión específicos de receptores de IgG o IgA.

También pueden usarse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente divulgación para modular FcγR o los niveles de FcγR en células efectoras, tal como por protección terminal y eliminación de receptores sobre la superficie celular. También pueden usarse para este fin mezclas de receptores anti-Fc.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, e inmunoconjugados) de la presente divulgación que tienen sitios de unión del complemento, tales como porciones de IgG1, -2 o -3 o IgM que se unen al complemento, también pueden usarse en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células, que comprende células diana con un agente de unión de la presente divulgación y células efectoras apropiadas, puede suplementarse por la adición del complemento o suero que contiene el complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la presente divulgación puede mejorarse por la unión de proteínas del complemento. En otra realización, las células diana recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente divulgación también pueden ser lisadas por el complemento. En otra realización más, las composiciones de la presente divulgación no activan el complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, e inmunoconjugados) de la presente divulgación también pueden administrarse junto con el complemento. Por consiguiente, dentro del alcance de la presente divulgación están composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas, y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas ya que el complemento está localizado en estrecha proximidad a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la presente divulgación, y el complemento o suero pueden administrarse por separado.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden usarse en combinación con uno o más anticuerpos terapéuticos adicionales u otros agentes de unión tales como proteínas de fusión de Ig. Ejemplos no limitantes de otros anticuerpos o agentes de unión con los que puede administrarse en combinación un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación incluyen anticuerpos o agentes de unión a CTLA-4, PSMA, CD30, IP-10, IFN-γ, CD70, PD-1, PD-L1, INF, TNF-R, VEGF, VEGF-R, CCR5, IL-1, IL-18, IL-18R, CD19, Campath-1, EGFR, CD33, CD20, Her-2, CD25, gpllb/llla, IgE, CD11a, α4 integrina, IFNα e 1FNAR1.

Dentro del alcance de la presente divulgación también están kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la presente divulgación (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, 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 adicionales de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítope en el antígeno CXCR4 diferente del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, se puede administrar adicionalmente a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la presente divulgación (antes de, simultáneamente con o tras la administración de un anticuerpo humano de la presente divulgación) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de Fcγ o receptores de Fcγ, por ejemplo, tratando el sujeto con una citocina. Citocinas preferidas para la 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), interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente divulgación también pueden usarse para dirigir células que expresan CXCR4, por ejemplo, para marcar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede enlazarse a una molécula que pueda detectarse. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para la localización *ex vivo* o *in vitro* de células que expresan CXCR4. La marca detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor

enzimático.

En una realización particular, la presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CXCR4 en una muestra o medir la cantidad de antígeno CXCR4, que comprenden 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 CXCR4, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo, o porción del mismo, y CXCR4. Posteriormente se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia de formación del complejo entre la muestra en comparación con la de la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno CXCR4 en la muestra.

En una realización más, los inmunoconjugados de la presente divulgación pueden usarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores CXCR4 en la superficie celular enlazando tales compuestos al anticuerpo. Así, la presente divulgación proporciona también métodos para la localización *ex vivo* o *in vivo* de células que expresan CXCR4 (por ejemplo, con una marca detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden usarse para destruir células que tienen receptores CXCR4 en la superficie celular dirigiendo las citotoxinas o radiotoxinas a CXCR4.

Se sabe que CXCR4 se expresa en una amplia variedad de tipos de células tumorales y también se sabe que participa en la metástasis tumoral. Además, como co-receptor para la entrada de VIH en linfocitos T, se sabe que CXCR4 participa en la infección por VIH. Adicionalmente, se ha mostrado que la vía de CXCR4/SDF-1 participa en afecciones inflamatorias. Más aún, se ha mostrado que la vía de CXCR4/SDF-1 participa en la angiogénesis o la neovascularización. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CXCR4 (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de la presente divulgación pueden usarse para modular la actividad de CXCR4 en cada una de estas situaciones clínicas, como sigue:

A. Cáncer

Se ha mostrado que CXCR4 se expresa por varios tipos de cánceres y en ciertas situaciones se ha establecido una correlación inversa entre la expresión de CXCR4 y el pronóstico o supervivencia del paciente. Ejemplos no limitantes de tipos de cánceres asociados con la expresión de CXCR4 incluyen: cáncer de mama (Muller, A. et al (2001) Nature 410:50-56); ovárico (Scotton, C. et al. (2001) Br. J. Cancer 85:891-897; de próstata (Taichman, R.S. et al. (2002) Cancer Res. 62:1832-1837; carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Spano J.P. et al. (2004) Ann. Oncol. 15:613-617); pancreático (Koshiba, T. et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:3530-3535); de tiroides (Hwang, J.H. et al. (2003) J. Clin. Endocrinol. Metab. 88:408-416); carcinoma nasofaríngeo (Wang, N. et al. (2005J J. Transl. Med. 3:26-33); melanoma (Scala, S. et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:1835-1841); carcinoma de células renales (Staller, P. et al (2003) Nature 425:307-311); linfoma (Bertolini, F. et al. (2002) Cancer Res. 62:3530-3 535); neuroblastoma (Geminder, H. et al. (2001) J. Immunol. 167:4747-4757); glioblastoma (Rempel, S.A. et al (2000) Clin. Cancer Res. 6:102-111); rabdomiosarcoma (Libura, J. et al. (2002) Blood 100:2597- 2606); colorrectal (Zeelenberg, I.S. et al (2003) Cancer Res. 63:3833-3839); de riñón (Schrader, A.J. et al. (2002) Br. J. Cancer 86:1250-1256): osteosarcoma (Laverdiere, C. et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2561-2567); leucemia linfoblástica aguda (Crazzolara, R. et al. (2001) Br. J. Haematol. 1 15:545-553): y leucemia mieloide aguda (Rombouts, E.J.C. et al. (2004) Blood 104:550-557).

En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento de cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, ovárico, de próstata, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, pancreático, de tiroides, carcinoma nasofaríngeo, melanoma, carcinoma de células renales, linfoma, neuroblastoma, glioblastoma, rabdomiosarcoma, colorrectal, de riñón, osteosarcoma, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros tratamientos de cáncer, tales como cirugía y/o radiación, y/o con otros agentes antineoplásicos, tales como los agentes antineoplásicos tratados y expuestos anteriormente, que incluyen fármacos quimioterapéuticos y otros anticuerpos de antígenos antitumorales, tales como aquellos que se unen a CD20, Her2, PSMA, Campath-1, EGFR y similares.

B. Infecciones virales (incluida infección por el VIH

Se ha mostrado que CXCR4 es un co-receptor para la entrada del VIH en linfocitos T y, adicionalmente, se ha demostrado que ciertos anticuerpos anti-CXCR4 murinos son capaces de inhibir la entrada de cepas aisladas del VIH en linfocitos T (véanse Hou, T. et al. (1998; J. Immunol. 160:180-188; Carnec, X. et al. (2005) J. Virol. 79:1930-1938). Por lo tanto, CXCR4 puede ser usado como receptor por virus para entrar en la célula, y los anticuerpos para CXCR4 pueden usarse para inhibir la entrada en la célula de tales virus que usan CXCR4 como receptor. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CXCR4 humanos de la presente divulgación pueden usarse para inhibir la entrada de un virus en una célula, en la que el virus usa CXCR4 como receptor para la entrada en la célula, de modo que se inhiba la infección viral. En una realización preferida, los anticuerpos se usan para inhibir la entrada del VIH en linfocitos T, por ejemplo, en el tratamiento o la prevención del VIH/SIDA. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antivirales, tales como fármacos antirretrovirales, tales como AZT o inhibidores de

proteasas.

C. Afecciones inflamatorias

Se ha mostrado que la vía de CXCR4/SDF-1 desempeña una función en varias afecciones inflamatorias, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria del hígado (Terada, R. et al. (2003) Lab. Invest. 83:665-672); inflamación articular autoinmunitaria (Matthys, P. et al (2001) J. Immunol 167:4686-4692); enfermedad alérgica respiratoria (Gonzalo, J.A. et al. (2000) J. Immunol. 165:499-508); y enfermedad periodontal (Hosokawa, Y. et al. (2005) Clin. Exp. Immunol. 144:467-474).

Por consiguiente, los anticuerpos anti-CXCR4 humanos de la presente divulgación que inhiben la unión de SDF-1 a CXCR4 pueden usarse para inhibir la inflamación en trastornos inflamatorios, que incluyen trastornos seleccionados del grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad articular autoinmunitaria, enfermedad alérgica respiratoria, enfermedad periodontal, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, diabetes de tipo 1, trastornos inflamatorios de la piel (por ejemplo, psoriasis, liquen plano), enfermedad autoinmunitaria de la tiroides, síndrome de Sjögren, inflamación pulmonar (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis pulmonar, alveolitis linfocítica) y enfermedad inflamatoria del hígado (por ejemplo, nefropatía por IgA, glomerulonefritis). El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antiinflamatorios, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), metotrexato, inhibidores de COX-2, antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept, infliximab, adalimumab) e inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A).

D. Angiogénesis

Se ha demostrado que SDF-1 induce la neovascularización mediante el reclutamiento de hemangiocitos que expresan CXCR4 (Jin, D.K. et al. (2006) Nat. Med. 12:557-567). Además, el bloqueo de la vía de SDF-1/CXCR4 puede atenuar el crecimiento tumoral *in vivo* inhibiendo la angiogénesis de una forma independiente de VEGF (Guleng, B. et al. (2005) Cancer Res. 65:5864-58-71). Más aún, como se demuestra en el Ejemplo 2, los anticuerpos de la presente divulgación son capaces de inhibir la formación de tubos capilares *in vitro*. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación que inhiben la unión de SDF-1 a CXCR4 pueden usarse para inhibir la angiogénesis interfiriendo con la vía de SDF-1/CXCR4. La inhibición de la angiogénesis puede usarse, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o la metástasis tumoral (independientemente de si el tumor es $CXCR4^+$). El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes antiangiogénicos, tales como anticuerpos anti-VEGF.

E. Trasplante autólogo de células madre

Las células madre de la sangre periférica son la fuente preferida de células madre para uso en el trasplante autólogo de células madre, por ejemplo, en el tratamiento de ciertos tumores malignos hematológicos. La obtención de células madre a partir de la sangre periférica requiere la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica. Han participado varias citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión en la regulación de este proceso (revisado en Gazitt, Y. (2001) J. Hematother. Stem Cell Res. 10:229-236), que incluye la interacción de CXCR4 y SDF-1. Además, se ha demostrado que un antagonista de CXCR4 de molécula pequeña estimula la rápida movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la periferia (véase, por ejemplo, Devine, S.M. et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:1095-1102; Broxmeyer, H.E. et al. (2005) J. Exp. Med. 201:1307-1318; Flomenberg, N. et al. (2005) Blood 106:1867-1874). Por consiguiente, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación que inhiben la actividad de CXCR4 (es decir, anticuerpos antagonistas) pueden usarse para estimular la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica para permitir el uso de tales células madre en trasplantes (por ejemplo, trasplante autólogo), por ejemplo, en el tratamiento de trastornos hematológicos, tales como mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin. El anticuerpo puede usarse solo o en combinación con otros agentes usados para estimular la movilización de células madre, tales como G-CSF y/o GM-CSF. Así, en otra realización, la invención proporciona un método para estimular la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención tal que se estimule la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica. El método puede comprender además obtener células madre $CD34^+$ de sangre periférica, tal como para uso en el trasplante autólogo de células madre.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra CXCR4

Se generaron anticuerpos monoclonales humanos anti-CXCR4 usado un enfoque de combinación en el que, primero, se inmunizaron ratones que expresaban genes de anticuerpos humanos para producir en los ratones un repertorio de inmunoglobulinas humanas específicas para CXCR4 humano y, después, segundo, se preparó una biblioteca de anticuerpos humanos a partir de células del bazo del ratón y se expresaron en fagos, de forma que los fagos se cribaron posteriormente para la expresión de anticuerpos con especificidad para CXCR4. Este enfoque de combinación se describe generalmente en la solicitud de EE.UU. Nº 20030091995 de Buechler et al.

Antígeno

Se transfectaron células R1610 (una línea celular pulmonar de hámster chino, descrita originariamente en Thirion, J.P. et al. (1976) Genetics 83:137-147) con un vector de expresión que codificaba la proteína CXCR4 de longitud completa humana, de forma que la proteína se expresó sobre la superficie de las células. Se usó una forma con codones optimizados del ADNc de CXCR4 en el vector de expresión, que se preparó como se describe en Mirzabekov, T. et al. (1999), J. Biol. Chem. 274:28745-28750. Para potenciar la inmunogenicidad de las células, las células se recubrieron con trinitrofenol (TNP), por incubación con una disolución acuosa de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), comercialmente disponible como una disolución al 5 % (Sigma, Cat. nº P2297). Más específicamente, se lavaron 1 x 10^8 células una vez con PBS estéril, se incubaron con 50 µl de la disolución de TNBS comercial al 5 % durante una hora a oscuras a temperatura y a continuación se lavaron tres veces con PBS. Las células R1610 que expresaban CXCR4 recubiertas de TNP resultantes se usaron como antígeno para la inmunización. El inmunogén final fue una mezcla de 100 µl de células lavadas recubiertas de TNP (1x10^7 células) más 100 µl de adyuvante de Ribi. Los ratones recibieron seis dosis de inmunogén con el tiempo.

Cepa KM Mouse® transcromosómica transgénica

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para CXCR4 inicialmente inmunizando la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, que expresa genes de anticuerpos humanos. En esta cepa de ratón, el gen de la cadena ligera kappa endógena de ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en Chen et al. (1993) EMBO J. 12:81 1-820 y el gen de la cadena pesada endógena de ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Adicionalmente, esta cepa de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5 (como se describe en Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851) y también contiene el transcromosoma SC20, que lleva el locus de la cadena pesada de Ig humana, como se describe en la publicación PCT WO 02/43478. Los ratones KM también se describen en detalle en la solicitud de EE.UU. Nº 20020199213.

Inmunización de KM

Para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos para CXCR4, ratones de la cepa KM Mouse® se inmunizaron con células R1610 transfectadas para expresar CXCR4 y recubiertas con TNP (como se describió anteriormente para el antígeno). Los esquemas de inmunización generales para la producción de anticuerpos humanos en cepas de ratones que llevan genes de anticuerpos humanos se describen en Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno.

Los ratones KM se inmunizaron con antígeno en adyuvante de Ribi intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o a través de las almohadillas de las patas (FP), seguido de re-inmunización IP, Sc o FP a los 3-21 días (durante un total de 6 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante de Ribi. La respuesta inmunitaria se monitorizó mediante extracciones de sangre retroorbitales. El plasma se cribó por tinción FACS de células R1610 que expresaban CXCR4 (frente a células R1610 parentales sin tranfectar). Se usaron ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-CXCR4 para recoger los bazos.

Preparación de la biblioteca de expresión en fagos y cribado para anticuerpos anti-CXCR4

Se usaron los bazos recogidos de los ratones inmunizados descritos anteriormente para crear una biblioteca de expresión en fagos que expresaba las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos. Más específicamente, se aisló el ARN de los bazos, se preparó el ADNc a partir del RNA, y el ADNc de la región variable del anticuerpo humano se amplificó específicamente por PCR, esencialmente como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20030091995 de Buechler et al. La biblioteca de las regiones variables de anticuerpo humano se clonó en vectores de expresión en fagos, de nuevo esencialmente como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20030091995 de Buechler et al. La biblioteca de expresión en fagos se cribó para miembros de la biblioteca con afinidad por CXCR4 inmunopurificando con CXCR4 humano incorporado en proteoliposomas magnéticos (CXCR4-MPL). Se han descrito previamente MPL que expresan CXCR4, u otros siete receptores transmembranarios (7TM) (por ejemplo, CCR5), de forma que la conformación nativa del receptor de 7TM se mantuviera (véase, por ejemplo,

Mirzabekov, T. et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:649-654; Babcock, G.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:38433-38440; publicación PCT WO 01/49265; solicitud de patente de EE.UU. 20010034432). En resumen, CXCR4 humano recombinante que contenía una marca de epítope se solubilizó a partir de una línea celular transfectada que expresaba CXCR4 usando el detergente CHAPSO, y la proteína se capturó sobre perlas magnéticas por medio de la marca de epítopes. Se reconstituyó una membrana lipídica durante la eliminación del detergente, de tal forma que se mantuvo la conformación nativa en la membrana de CXCR4, para crear las CXCR4-MPL. Tres rondas de inmunopurificación de la biblioteca de expresión en fagos en las CXCR4-MPL condujeron a un enriquecimiento de 30 veces de ligantes de CXCR4 en comparación con el nivel basal. Se volvieron a clonar los fragmentos de la región variable de interés en un vector de expresión Fab y se volvió a ensayar el Fab para la unión a antígeno frente a células transfectadas que expresaban CXCR4. Entonces se generaron anticuerpos completos a partir de los Fab usando técnicas estándar de biología molecular.

Se seleccionaron los clones de Fab de F7, F9, D1 y E2 para análisis posteriores.

<u>Ejemplo 2</u>: Caracterización estructural de los anticuerpos monoclonales humanos anti-CXCR4 F7, F9, D1 y E2

Se secuenciaron las secuencias de ADNc que codificaban las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los clones de Fab de F7, F9, D1 y E2, obtenidos del cribado de la biblioteca de expresión en fagos como se describió en el Ejemplo 1, usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F7 se muestran en la Figura 1A y en SEC ID Nº: 33 y 25, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F7 se muestran en la Figura 1B y en SEC ID Nº: 37 y 29, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina F7 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de F7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Análisis posteriores de la secuencia V_H de F7 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 1A y en SEC ID Nº: 1, 5 y 9, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina F7 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de F7 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Análisis posteriores de la secuencia V_L de F7 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 1B y en SEC ID Nº: 13, 17 y 21, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F9 se muestran en la Figura 2A y en SEC ID Nº: 34 y 26, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F9 se muestran en la Figura 2B y en SEC ID Nº: 38 y 30, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina F9 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de F9 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Análisis posteriores de la secuencia V_H de F9 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 2A y en SEC ID Nº: 2, 6 y 10, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina F9 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de F9 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Análisis posteriores de la secuencia V_L de F9 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 2B y en SEC ID Nº: 14, 18 y 22, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de D1 se muestran en la Figura 3A y en SEC ID Nº: 35 y 27, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de D1 se muestran en la Figura 3B y en SEC ID Nº: 39 y 31, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina D1 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de D1 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Análisis posteriores de la secuencia V_H de D1 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 3A y en SEC ID Nº: 3, 7 y 11, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina D1 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de D1 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Análisis posteriores de la secuencia V_L de D1 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 3B y en SEC ID Nº: 15, 19 y 23, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de E2 se muestran en la Figura 4A y en SEC ID Nº: 36 y 28, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de E2 se muestran en la Figura 4B y en SEC ID Nº: 40 y 32, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina E2 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de E2 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Análisis posteriores de la secuencia V_H de E2 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se muestra en la Figura 4A y en SEC ID Nº: 4, 8 y 12, respectivamente.

La comparación de la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina E2 con las secuencias de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de E2 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Análisis posteriores de la secuencia V_L de E2 usando el sistema de Kabat de determinación de las regiones CDR condujeron a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se muestra en la Figura 4B y en SEC ID Nº: 16, 20 y 24, respectivamente.

El análisis de la secuencias de la región estructural de las regiones V_H y V_L de F7, F9, D1 y E2, en comparación con las secuencias de la línea germinal de las que se derivaron, identificó varios residuos de aminoácidos de la región estructural que se diferenciaban de los de la línea germinal. Se eligieron ciertos residuos de la región estructural en las regiones del extremo N de los segmentos V_H y V_L para “retromutación” para restaurar los residuos de la región estructural a la secuencia de la línea germinal, debido a que estos residuos no pertenecen de la línea germinal en la porción del extremo N estuvieron codificados por los cebadores usados para crear las bibliotecas de expresión en fagos descritas en el Ejemplo 1. En particular, las siguientes formas modificadas de los segmentos V_H y V_L de F7, F9, D1 y E2 (denominadas formas “GL”, de la línea germinal) se crearon usando técnicas estándar de biología molecular para sustituir el residuo de aminoácido de la línea germinal en la posición de la región estructural indicada:

F7GL V_H: Q1E, Q6E
F7GL V_k: AID, R3Q

F9GL V_H: Q1E, Q6E
F9GL V_k: E1D, V3Q y L4M.

D1GL V_H: Q6E
D1GL V_k: VID, W3Q y V4M

E2GL V_H: Q6E
E2GL V_k: E1D, V3Q y L4M.

La Figura 5A muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F7 (SEC ID Nº: 25) y de F7GL (SEC ID Nº: 41) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_H 3-48 (SEC ID Nº: 49). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 5B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F7 (SEC ID Nº: 29) y de F7GL (SEC ID Nº: 45) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_H L15 (SEC ID Nº: 50). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6A muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F9 (SEC ID Nº: 26) y de F9GL (SEC ID Nº: 42) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada

por V_H 3-48 (SEC ID Nº: 49). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 6B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F9 (SEC ID Nº: 30) y de F9GL (SEC ID Nº: 46) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_H L15 (SEC ID Nº: 50). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 7A muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de D1 (SEC ID Nº: 27) y de D1GL (SEC ID Nº: 43) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_H 3-48 (SEC ID Nº: 49). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 7B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de D1 (SEC ID Nº: 31) y de D1GL (SEC ID Nº: 47) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_K L15 (SEC ID Nº: 50). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 8A muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de E2 (SEC ID Nº: 28) y de E2GL (SEC ID Nº: 44) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_H 3-48 (SEC ID Nº: 49). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

La Figura 8B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de E2 (SEC ID Nº: 32) y de E2GL (SEC ID Nº: 48) con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal codificada por V_K L15 (SEC ID Nº: 50). Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 están delineadas.

Los fragmentos Fab de F7, F9, D1 y E2 se convierten en anticuerpos de longitud completa usando técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN que codifica las regiones V_H y V_K de uno de los fragmentos Fab puede clonarse en un vector de expresión que lleva las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, de tal forma que las regiones variables se enlacen operativamente a las regiones constantes. Alternativamente, pueden usarse vectores separados para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados para uso en la creación de anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 20050153394 de Black.

Ejemplo 3: Características de unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CXCR4

En este ejemplo, se examinaron las características de unión de los anticuerpos anti-CXCR4 por citometría de flujo.

Se usó la línea de linfocitos T humana CEM, que expresa CXCR4 nativo humano sobre su superficie celular, para examinar la capacidad de los anticuerpos F7, F9, D1 y E2 para unirse a CXCR4 nativo de la superficie celular. Se valoraron F7, F9, D1 y E2 de longitud completa en una serie de diluciones en serie 1:3, produciendo un intervalo de concentraciones de 300 nM a 5 pM. A continuación, los anticuerpos se mezclaron con células CEM y se dejó que se unieran antes de ser detectados con un anticuerpo anti-IgG humana secundario conjugado con FITC. Las células se analizaron a continuación por citometría fluorescente. Las intensidades de fluorescencia medias resultantes se muestran en la gráfica de la Figura 9, que demuestra que los cuatro anticuerpos anti-CXCR4 se unen a células CEM. Las CE_{50} para la unión de F7, F9, D1 y E2 fueron 21 nM, 14 nM, 80 nM y 290 nM, respectivamente.

Para determinar la capacidad de un panel de anticuerpos anti-CXCR4 para competir por la unión a CXCR4, se realizaron estudios de competición. Se usaron los cuatro anticuerpos anti-CXCR4 humanos F9, F7, E2 y D1, junto con cuatro anticuerpos anti-CXCR4 monoclonales murinos comercialmente disponibles (12G5, 708, 716 y 717; nº de catálogo de R&D Systems: MAB170, MAB171, MAB172 y MAB173, respectivamente). Los anticuerpos anti-CXCR4 se valoraron en una serie de diluciones en serie 1:3, produciendo un intervalo de concentraciones de 300 nM a 5 pM en presencia de una concentración constante de anticuerpo anti-CXCR4 F9 marcado con FITC. A continuación, la mezcla de anticuerpos se añadió a células CEM y se dejó que se unieran. La capacidad de cada anticuerpo para competir con F9 por la unión a las células CEM se evaluó por citometría fluorescente y detección de FITC. Las intensidades de fluorescencia medias resultantes se muestran en la gráfica de la Figura 10, que demuestra que los siete anticuerpos examinados (F7, E2, D1, 12G5, 708, 716 y 717) fueron capaces de competir con F9 por la unión a células CEM, aunque el anticuerpo E2 solo demostró inhibición parcial a concentraciones altas en comparación con los otros anticuerpos.

En otro conjunto de experimentos, se examinó la capacidad del mAb F7 para unirse a varias líneas celulares diferentes por citometría de flujo llevando a cabo una valoración FACS. Se incubaron cantidades crecientes de mAb (desde menos de 0,001 μg/ml a más de 100 μg/ml) con 100,00 células y se evaluó la unión por citometría de flujo. También se determinó el valor de Bmáx, que indica aproximadamente cuántas moléculas de CXCR4 están presentes en cada célula. Basándose en las curvas de unión, se determinó una CE_{50} para la unión de los anticuerpos, cuyos resultados se resumen a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1: Resultados de la valoración FACS para la unión de mAb F7 a diferentes líneas celulares

Tipo de célula	CE_{50} (µg/ml)	Bmáx
Ramos	0,48	106.000
Raji	0,34	52.536
Namalwa	1,57	116.000
L540	3,69	31.868
DMS79	3,99	24.587
MDA-MB-231	9,24	14.186
Bmáx = unión máxima (unidades de GMFI)		

Los resultados muestran que el mAb F7 es capaz de unirse eficazmente a cada una de las seis líneas celulares probadas, con las CE_{50} más bajas observadas con las líneas celulares Ramos y Raji. Estos datos también muestran que la expresión del receptor CXCR4 es la mayor para las células Ramos y Namalwa, y la menor para las células MDA-MB-231 y las células DMS79.

En otro experimento de unión, se examinó la capacidad del mAb F7 para unirse a diferentes subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP). Se aislaron CMSP humanas por métodos estándar y los diferentes subconjuntos celulares se aislaron por FACS. En particular, se aislaron los siguientes subconjuntos celulares: (i) $CD3^+$, (ii) $CD20^+$; (iii) $CD11b^+$ y (iv) $CD14^+$. Los experimentos de citometría de flujo realizados con el mAb F7 (a 33 µg/ml) demostraron que el mAb F7 fue capaz de unirse eficazmente a cada uno de los cuatro subconjuntos, en comparación con un anticuerpo de control del mismo isotipo.

Ejemplo 4: Inhibición de la unión de SDF-1 a CXCR4 por anticuerpos anti-CXCR4

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la unión de SDF-1 a CXCR4, se realizó un estudio de competición usando SDF-1 marcado con ^{125}I y células CEM, que expresan CXCR4 de forma natural. Se realizó una comparación de los anticuerpos anti-CXCR4 en el bloqueo de la unión de SDF-1 a células CEM por un ensayo de unión de radioligandos estándar. Los anticuerpos anti-CXCR4 se diluyeron en serie 1:3 para dar un intervalo de concentraciones de 300 nM a 137 pM. Los anticuerpos se añadieron a 750.000 células CEM en 100 µl en presencia de ^{125}I-SDF-1 100 pM con una actividad específica de 2000 Ci/mmol (Amersham, nº de catálogo IM314-25UC1). Se usó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo como control negativo. Se determinó el ligando radiomarcado unido total posible dejando que ^{125}I-SDF-1 se uniera a células CEM en ausencia de anticuerpos durante 2 horas a 4 ºC. Se determinó la unión no específica del ligando radiomarcado dejando que ^{125}I-SDF-1 se uniera en presencia de SDF-1 sin marcar 1 µM (Peprotech, nº de catálogo 300-28A). La cantidad de ^{125}I-SDF-1 asociado a células se determinó por métodos estándar. Los resultados se muestran en la Figura 11, que demuestra que el anticuerpo F7 proporciona el bloqueo más eficaz de la unión de SDF-1 a CXCR4 expresado en células CEM. Los anticuerpos F9 y D1 también bloquearon la unión de SDF-1, aunque de forma más moderada que F7. El anticuerpo E2, aunque se une a CXCR4 en células CEM (como se demostró en el Ejemplo 3), no bloqueó eficazmente la unión de SDF-1 a CXCR4 en células CEM. Las CE_{50} para el bloqueo de SDF-1 por F7, F9 y D1 fueron de 2,3 nM, 12,5 nM y 28,6 nM, respectivamente.

Ejemplo 5: Inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 por anticuerpos anti-CXCR4

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir el flujo de calcio en células CEM inducido por SDF-1, primero se marcaron células CEM con el colorante fluorescente Calcium 3 (Molecular Devices). Se valoraron los anticuerpos anti-CXCR4 en una serie de diluciones en serie 1:3, produciendo un intervalo de concentraciones de 100 nM a 1 pM, y se dejó que se uniera a 200.000 células CEM en 200 µl y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente antes de cargarse en un equipo Flexstation (Molecular Devices). Como control negativo se usó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. A continuación, las células se estimularon con una concentración final de SDF-1 humano recombinante 50 nM (Peprotech), añadido como 500 nM en un volumen de 22 µl para un volumen final de 222 µl. El flujo de calcio resultante se midió durante 200 segundos por pocillo. Como control positivo, se estimularon células en ausencia de anticuerpo con SDF-1α (preparado en solución salina tamponada con Hank (HBS) con 0,1 % de BSA o HBS) para obtener una señal de flujo calcio posible máxima. Para determinar un nivel inicial, las células se estimularon con HBS con 0,1 % de BSA. Se midió la liberación de calcio estimulada por SDF-1α por el desarrollo de fluorescencia dependiente de calcio con el tiempo. El área bajo la curva de la traza de fluorescencia resultante se informó como una indicación del flujo de calcio. La inhibición resultante del flujo de calcio por los anticuerpos anti-CXCR4 se representa en la Figura 12. Se representaron los datos y se calcularon las CE_{50} usando el software GraphPad Prism y el ajuste no lineal de la curva, y la fórmula de respuesta sigmoidal a la dosis. Los anticuerpos F7, F9 y D1 inhibieron el flujo de calcio inducido por SDF-1α. El anticuerpo E2, aunque se unió a CXCR4 (como se demostró en el Ejemplo 3), no inhibió significativamente el flujo de calcio inducido por SDF-1α. Las CE_{50} para la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 por F7, F9 y D1 fueron 0,90 nM, 0,32 nM y 0,57 nM, respectivamente.

Ejemplo 6: Inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células CEM por anticuerpos anti-CXCR4

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la migración de células CEM inducida por SDF-1, primero se marcaron células CEM con el reactivo BATDA (Perkin Elmer). Se valoraron los anticuerpos anti-CXCR4 en una serie de diluciones en serie 1:3, produciendo un intervalo de concentraciones de 100 nM a 1 pM, y se dejó que se unieran a células CEM marcadas a una densidad de 10 millones de células por ml. Como control negativo se usó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. Se añadieron 30 μl de SDF-1α humano recombinante (Peprotech) 5nM por pocillo a la cámara inferior de una placa de migración Neuroprobe de 96 pocillos con filtros de 5,7 mm de diámetro por pocillo. Cada pocillo contenía poros 5 μM. Se cargaron células CEM marcadas con y sin anticuerpo sobre los filtros a una concentración de 0,5 millones de células por pocillo en un volumen de 50 μl. La placa de migración se incubó a 37 ºC durante 2,5 horas. Las células migradas se capturaron en la cámara inferior de la placa, se lisaron y se detectaron con disolución de detección de europio (Perkin Elmer). La señal quimioluminiscente se registró en un instrumento Fusion. La inhibición resultante de la migración inducida por SDF-1a por los anticuerpos anti-CXCR4 se muestra en la Figura 13. Los resultados demostraron que los anticuerpos F7 y F9 inhibieron la migración eficazmente, mientras que los anticuerpos D1 y E2 no inhibieron significativamente la migración. Las CE_{50} para la inhibición de la migración de células CEM inducida por SDF-1 por F7 y F9 fueron 12,44 nM y 18,99 nM, respectivamente.

Ejemplo 7: Inhibición de la formación de tubos capilares por HuVEC por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical (HuVEC). Se diluyó Matrigel 1:1 con RPMI y se colocó sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos y se dejó polimerizar durante 30 minutos a 37 ºC. Se tripsinaron HuVEC (de Cambrex, nº de cat. CC-2519) al 80 % de confluencia y se resuspendieron a 1 x 10^6 células por ml en RPMI con 0,5 % de FBS. Los anticuerpos se mezclaron bien con HuVEC a una concentración final de 3 μg/ml y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se usó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo o medio solo como control negativo. Como control positivo de la inhibición de la formación de tubos se usó un anticuerpo de ratón anti-αvβ3 (CD51/CD61) humano (R&D Systems, nº de cat. MAB3050). Se colocaron HuVEC con o sin anticuerpos sobre los pocillos recubiertos de Matrigel y se incubaron a 37 ºC durante 18 horas.

Las HuVEC incubadas con medio solo o con el anticuerpo de control del mismo isotipo formaron tubos capilares, produciendo la aparición de células conectadas a lo largo de la placa con 3-5 puntos de conexión o puntos de ramificación por célula. Las HuVEC incubadas con tanto los anticuerpos humanos anti-CXCR4 como el anticuerpo anti-αvβ3 no formaron tubos capilares. Las células parecían estar aisladas y con pocos o ningún punto de ramificación. Los anticuerpos anti-CXCR4 que fueron más eficaces en el bloqueo de la unión SDF-1, el flujo de calcio inducido por SDF-1 y la migración inducida por SDF-1, concretamente F7 y F9, fueron también los más eficaces en inhibir la formación de tubos capilares. El anticuerpo anti-CXCR4 E2, que se une a CXCR4 pero no bloquea la unión de SDF-1 o los efectos inducidos por SDF-1, no inhibió la formación de tubos capilares.

Ejemplo 8: Inhibición de la proliferación de células tumorales *in vitro* por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la proliferación de células tumorales Ramos (una línea celular de linfoma de Burkitt humano) *in vitro.* En el ensayo, se incubaron 1 x 10^4 células/pocillo con dosis crecientes (10^{-3} a 300 nM) de anticuerpo IgG4 F7, anticuerpo IgG1 F9, anticuerpo IgG1 E2, Fab' de anticuerpo F9 o isotipos de control. Las células se incubaron con anticuerpo durante 72 horas, añadiéndose ^{3}H-timidina durante las 24 horas finales de incubación para permitir la monitorización de la proliferación celular. Tras la incubación, se midió la incorporación de ^{3}H-timidina por las células por técnicas estándar. Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 14. Los resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos IgG4 F7, IgG1 F9 y IgG1 E2 fue capaz de inhibir la proliferación de células Ramos, como se indicó por el descenso de la incorporación de ^{3}H-timidina cuando se incubó con estos anticuerpos, mientras que el fragmento Fab' de F9 no inhibió la proliferación celular. Estos resultados indican que los anticuerpos humanos anti-CXCR4 tienen un efecto antiproliferativo directo sobre las células tumorales *in vitro* y, por lo tanto, no requieren entrecruzamiento secundario para conseguir un efecto antiproliferativo.

Ejemplo 9: Inhibición de la proliferación de células de un tumor sólido *in vitro* por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la proliferación de un tumor sólido establecido *in vivo* usando un modelo de células tumorales Ramos subcutáneas. En este ensayo, se implantaron 10 x 10^6 células Ramos/ratón en la región del costado de cada ratón y se dejaron crecer hasta un tamaño medio de 40 mm^3, calculado por longitud x anchura x altura/2 de los tumores. A continuación, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de una primera dosis de anticuerpo (designada como día 0 del tratamiento) y recibieron una segunda dosis i.p. de anticuerpo el día 7. Los ratones tratados con un fragmento Fab' de anticuerpo también recibieron dosis i.p. de anticuerpo el día 3 y el día 10. Se trataron grupos de ratones (n=8) con cualquiera de (i) vehículo; (ii) control de isotipo (15 mg/kg); (iii) IgG4 F7 (15 mg/kg); (iv) IgG1 F9 (15 mg/kg); (v) Fab' de F9 (10 mg/kg); o (vi) control positivo de anti-CD20 (15 mg/kg). El volumen tumoral y el peso corporal del ratón se

midieron a intervalos regulares (aproximadamente 2-3 veces/semana) entre el día 0 y el día 30 después de la dosis. Los resultados del experimento se presentan en las Figuras 15A, 15B y 15C, que muestran el volumen tumoral medio (Figura 15A), la mediana del volumen tumoral (Figura 15B) y la mediana del % de cambio en el peso corporal (Figura 15C). Los resultados mostraron que, como en el caso del control positivo, los anticuerpos IgG4 F7 e IgG1 F9 inhibieron significativamente el crecimiento celular tumoral como se mide por el aumento de volumen tumoral, mientras que el fragmento Fab' de F9 no inhibió el crecimiento celular tumoral en comparación con el control de isotipo. Todos los tratamientos fueron bien tolerados como indicó el que no se produjera ningún cambio de peso corporal significativo. Lo más probable es que las diferencias en los pesos corporales entre los tratamientos se debieran a los pesos de los tumores. Los resultaron indicaron que los anticuerpos humanos anti-CXCR4 son capaces de inhibir el crecimiento de un tumor sólido establecido *in vivo.*

Ejemplo 10: Aumento del tiempo de supervivencia en un modelo de células tumorales sistémicas de ratón por tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad de un anticuerpo humano anti-CXCR4 para aumentar el tiempo de supervivencia de ratones usando un modelo de células Ramos tumorales sistémicas. En este ensayo, se inyectaron 1 x 10^6 células Ramos/ratón intravenosamente (i.v.) en cada ratón el día 0. A continuación los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de una primera dosis de anticuerpo el día 1 (es decir, un día después de la administración i.v. de las células tumorales) y recibieron cuatro dosis i.p. más de anticuerpo, los días 5, 8, 15 y 22 (los ratones tratados con el anticuerpo de control positivo se trataron únicamente el día 1). Se trataron grupos de ratones (n=8) con cualquiera de (i) vehículo; (ii) control de isotipo (15 mg/kg); (iii) IgG1 F9 (15 mg/kg); o (iv) control positivo de anti-CD19 (15 mg/kg). Se midió el porcentaje de supervivencia a intervalos regulares entre el día 0 y el día 50 después de la dosis (se utilizó la parálisis de las patas traseras como punto final del experimento). Los resultados del experimento se presentan en la Figura 16, que muestra el porcentaje de supervivencia con el tiempo. La mediana del nº de días de supervivencia para los ratones tratados bien con vehículo o con el control de isotipo fueron 23 y 25,5 días, respectivamente, mientras que la mediana del nº de días de supervivencia de los ratones tratados con una dosis del control positivo de anti-CD19 fue de 39 días. Significativamente, el 100 % de los ratones en el grupo tratado con cinco dosis del anticuerpo IgG1 F9 sobrevivieron hasta el final del experimento. Estos resultados indican que el anticuerpo humano anti-CXCR4 es capaz de aumentar los tiempos de supervivencia de ratones en un modelo de células tumorales sistémicas.

Ejemplo 11: Inducción de la apoptosis por el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 F7

En este ejemplo se examinó la capacidad de mAb anti-CXCR4 F7 para inducir la apoptosis en células diferentes. En el ensayo de apoptosis, se incubó el mAb F7 a 10 µg/ml con células Ramos (500.000 células), células Namalwa (500.000 células) o células R1610 transfectadas para expresar CXCR4 (100.000 células). Se usaron células R1610 sin transfectar como control negativo. Se incubó el mAb anti-CXCR4 F7 o anticuerpo de control de isotipo con células a 37 ºC y se tomaron muestras de 250 µl a las 24, 48 y 72 horas. Para evaluar la apoptosis, se incubaron las células de distintos puntos de tiempo con anexina V-FITC-FL1 y yoduro de propidio-FL3, seguido por citometría de flujo. El porcentaje combinado de células recogidas en FL1, FL3 y los cuadrantes doblemente positivos FL1-FL3 se consideraron apoptósicas. Para eliminar el fondo, los porcentajes de células apoteóticas inducidas por el anticuerpo de isotipo se restaron del porcentaje de células apoptósicas inducidas por el mAb F7.

Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2: Inducción de la apoptosis por el mAb anti-CXCR4 mAb F7

Células	Tiempo (horas)	% de apoptosis
R1610	72	<1
R1610-CXCR4	24	39
R1610-CXCR4	48	58
R1610-CXCR4	72	46
Ramos	24	22
Ramos	48	31
Ramos	72	22
Namalwa	24	17
Namalwa	48	24
Namalwa	72	44
Los valores del % de apoptosis total están corregidos para los cambios del nivel inicial inducidos por los anticuerpos de control de isotipo.		

Los resultados demuestran que el mAb F7 es capaz de inducir la apoptosis en células Ramos, Namalwa y R1610-CXCR4, mientras que F7 no tuvo efecto sobre la inducción de la apoptosis de células R1610 parentales, que indica que la respuesta era específica para CXCR4.

Ejemplo 12: Estudios adicionales que muestran la inhibición de la proliferación de células de tumores sólidos *in vivo* por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad de anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la proliferación o inducir la apoptosis de tumores sólidos establecidos *in vivo* usando modelos de células tumorales adicionales similares al modelo Ramos descrito en el Ejemplo 9 anterior. Se examinaron varias líneas celulares tumorales. Los experimentos y resultados representativos son los siguientes:

En un experimento, se implantaron 7,5 x 10^6 células MDA-MB231 de cáncer de mama humanas/ratón en la región del costado de cada ratón y se dejaron crecer hasta un tamaño medio de 100 mm^3, calculado por longitud x anchura x altura/2 de los tumores, que era el día 7 después de la implantación. Los ratones se dividieron de forma aleatoria en grupos de tratamiento diferentes y recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de una primera dosis de anticuerpo el día 7 después de la implantación, recibieron una segunda dosis i.p. de anticuerpo el día 14 después de la implantación y luego recibieron una tercera dosis el día 46 después de la implantación. Se trataron grupos de ratones (n=9) con cualquiera de (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG1 (15 mg/kg); (iii) control de isotipo IgG4 (15 mg/kg); (iv) IgG1 F7 (15 mg/kg) o (v) IgG4 F7 (15 mg/kg). Los volúmenes tumorales se midieron a intervalos regulares y se determinó la media y mediana del volumen tumoral para cada grupo de tratamiento a cada intervalo. Los resultados de este experimento se resumen a continuación en la Tabla 3, que muestra la media del volumen tumoral (en mm^3) y el % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) el día 52, y la mediana del volumen tumoral (en mm^3) y el % de TGI el día 59 después de la implantación:

Tabla 3: Inhibición del crecimiento tumoral de células MDA-MB231 *in vivo* por el mAb F7

Tratamiento	Día 52		Día 59	
	Media	TGI (%)	Mediana	TGI (%)
Vehículo	154		187	
Control de isotipo IgG1	172		216	
Control de isotipo IgG4	188		226	
IgG1 anti-CXCR4 F7	86	50	130	40
IgG4 anti-CXCR4 F7	79	58	108	52

Adicionalmente, uno de los ratones del grupo de tratamiento IgG4 F7 estuvo libre de tumor el día 59. Los resultados demuestran que el mAb F7 es capaz de inhibir el crecimiento de células MDA-MB231 de cáncer de mama *in vivo.*

En un segundo experimento, se implantaron 5 x 10^6 células DMS79 de carcinoma de pulmón de células pequeñas humano/ratón en la región del costado de cada ratón y se dejaron crecer hasta un tamaño medio de 160 mm^3, calculado por longitud x anchura x altura/2 de los tumores, que fue el día 7 después de la implantación. Los ratones se dividieron de forma aleatoria en grupos de tratamiento diferentes y recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de anticuerpo siguiendo un programa de dosificación de Q3Dx5 (cinco veces cada tres días). Los grupos de ratones (n=10) se trataron con cualquiera de (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG4 (10 mg/kg) o (iii) IgG4 F7 (10 mg/kg). Los volúmenes tumorales se midieron a intervalos regulares y se determinó la media y la mediana del volumen tumoral para cada grupo de tratamiento a cada intervalo. Los resultados de este experimento se resumen a continuación en la Tabla 4, que muestra la media y la mediana del volumen tumoral (en mm^3) y el % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) el día 34 después de la implantación:

Tabla 4: Inhibición del crecimiento tumoral de células DMS79 *in vivo* por el mAb F7

Tratamiento	Día 34			
	Media	TGI (%)	Mediana	TGI (%)
Vehículo	900		882	
Control de isotipo IgG1	992		903	
IgG4 anti-CXCR4 F7	620	38	599	34

Los resultados demuestran que el mAb F7 es capaz de inhibir el crecimiento de células DMS79 de carcinoma de pulmón de células pequeñas humano *in vivo.*

Se probaron modelos de tumor de xenoinjerto subcutáneo adicionales para la capacidad de los anticuerpos anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento tumoral, en experimentos similares a los descritos anteriormente y en el Ejemplo 9. En un experimento usando células SU-DHL-6 de linfoma de linfocitos B, los resultados mostraron que el tratamiento con el mAb IgG4 F7 a 15 mg/kg produjo aproximadamente el 60 % de inhibición del crecimiento tumoral.

Similarmente, en un experimento usando células Namalwa de linfoma de Burkitt, los resultados mostraron que el tratamiento con el mAb IgG4 F7 a 3 mg/kg produjo aproximadamente el 70 % de inhibición del crecimiento tumoral. Por el contrario, no se observó inhibición del crecimiento tumoral por el mAb F7 en experimentos usando células NIH-H226 de carcinoma pulmonar o células HPAC de adenocarcinoma pancreático humano. Sin embargo, la tinción de estas células por el mAb F7 en experimentos de citometría de flujo mostró una expresión mínima *in vitro*. Aunque las células tumorales *in vivo* se tiñeron por el mAb por inmunohistoquímica, no está claro en qué etapa de su crecimiento tumoral empezó a expresarse CXCR4. Esto sugiere que la expresión de CXCR4 por estas dos líneas celulares fue insuficiente para permitir la inhibición del crecimiento tumoral o la inducción de apoptosis *in vivo* mediante el tratamiento con anti-CXCR4.

Ejemplo 13: Inhibición de metástasis pulmonares *in vivo* por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo se examinó la capacidad del mAb anti-CXCR4 F7 para inhibir metástasis pulmonares usando un modelo tumoral sistémico de ratón C57. Más específicamente, se inyectaron intravenosamente 0,4 x 10^6 células B16-CXCR4 (células B16 transfectadas para expresar CXCR4 humano) en cada uno de los 30 ratones de la cepa C57. Los ratones se dividieron de forma aleatoria en tres grupos de diez ratones cada uno, que a continuación se trataron con cualquiera de (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG4 (5 mg/kg) o (iii) F7 IgG4 (5 mg/kg). El anticuerpo o vehículo se inyectó intraperitonealmente 30 minutos después de que se inyectaran las células B16-CXCR4 intravenosamente. Se recogieron los pulmones el día 14 y se cuantificó el número de nódulos de metástasis pulmonares. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 5, que muestra la media y la mediana del número de metástasis pulmonares en cada grupo:

Tabla 5: Inhibición de metástasis pulmonares *in vivo* por el mAb F7

Tratamiento	Número de metástasis pulmonares		% de inhibición de metástasis pulmonares (media)
	Media	Mediana	
Vehículo	364	397	
Control de isotipo IgG4	309	294	15 %
IgG4 anti-CXCR4 F7	157	186	56 %

Los resultados muestran que el tratamiento con el mAb F7 condujo a una reducción en el número medio de nódulos de metástasis pulmonares del 56 %, mientras que la reducción fue solo del 15 % con el anticuerpo de control de isotipo, que demuestra que el mAb F7 es capaz de inhibir metástasis pulmonares en un modelo tumoral sistémico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MEDAREX, INC.

<120> ANTICUERPOS HUMANOS QUE SE UNEN A CXCR4 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> MXI-375PC

<140>
<141>

<150> 60/827.851
<151> 02-10-2006

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Ser Tyr Ser Met Asn
  1               5
```

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Ser Tyr Ser Met Asn
  1               5
```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
Ser Tyr Ser Met Asn
  1               5
```

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Ser Tyr Ser Met Asn
  1               5
```

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

```
Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
  1               5                  10                  15

Gly
```

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

```
Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
  1               5                  10                  15

Gly
```

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13

<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

```
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1               5                   10
```

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

```
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1               5
```

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

```
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1               5
```

<210> 19

<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 25

<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 28
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Ala Ile Arg Met 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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

```
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 Asn Trp
             20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
         35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
                 85                  90                  95

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

<210> 33
<211> 375
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

<400> 33

```
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta 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

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

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

tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg   192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat 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 gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg   336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca               375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 34
<211> 375
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

<400> 34

```
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta 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

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

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

tca tac att agt agt aga agt aga agc ata tac tac gca gac tct gtg   192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tac   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 gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt    288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg    336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 35
<211> 375
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

<400> 35

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

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

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

tca tac att agt agt cgt agt aaa acc ata tac tac gca gac tct gtg    192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg    336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 36
<211> 375
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)

<400> 36

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

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

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

tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg   192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat 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 gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt   288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac cac tac tac tac ggt atg   336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca               375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 37
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 37

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

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg    96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
             20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc   144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
         35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc   192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 gta act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg    288
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr 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> 38
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 38

```
gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga    48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg    96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc    144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca cca agg ttc agc ggc    192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro 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 tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg    288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr 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> 39
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 39

```
gtc atc tgg gtg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga    48
Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15
gac aga gtc acc atc act tgt cgg acg agt cag ggt att agc agc tgg    96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct gag ctc ctg atc   144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc   192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg   288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr 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
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 40

```
gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta ggg    48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc aac tgg    96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
             20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc   144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
         35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc   192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 gcg act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg   288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr 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> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

```
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 Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 42
<211> 125
<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 Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

```
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 Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

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

<210> 44
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

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

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

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Asp Ile Gln Met 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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

```
Asp Ile Gln Met 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 Trp
             20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
         35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
                 85                  90                  95

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

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
             20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
         35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
                 85                  90                  95

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

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Asp Ile Gln Met 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 Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 49
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala 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 Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 50
<211> 95
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Asp Ile Gln Met 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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 51
<211> 352
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110
His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
180 185 190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
195 200 205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
210 215 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
225 230 235 240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
245 250 255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
260 265 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
290 295 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
305 310 315 320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
325 330 335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
340 345 350

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

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

Thr Val Ser Ser
20

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular y comprende:

una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 1;
una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 5;
una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 9;
una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 13;
una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 17; y
una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 21.

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

una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 25 y una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 29.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de longitud completa.

4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo monoclonal es del isotipo IgG1 o IgG4.

5. La porción de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicha porción de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv o un scFv.

6. La porción de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 5, en donde dicha porción de unión a antígeno es un fragmento $F(ab')_2$.

7. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, enlazado a un agente terapéutico;
opcionalmente en el que el agente terapéutico es una citotoxina o un isotipo radiactivo.

8. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo monoclonal, o una porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 enlazada a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la del anticuerpo monoclonal o de la porción de unión a antígeno del mismo.

9. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquiera de:

(a) el anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
(b) el inmunoconjugado de la reivindicación 7; o
(c) la molécula biespecífica de la reivindicación 8.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

12. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 11.

13. Un método para preparar un anticuerpo anti-CXCR4, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende expresar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo en la célula huésped de la reivindicación 12 y aislar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de la célula huésped.

14. Un método *in vitro* para modular la actividad de CXCR4 en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo monoclonal, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 de forma que se module la actividad de CXCR4 en la célula;
opcionalmente en el que:

(a) la célula es una célula tumoral que expresa CXCR4 y el método produce la inhibición del crecimiento de la célula tumoral o la inhibición de la metástasis de la célula tumoral;
(b) la célula es un linfocito T que expresa CXCR4 y el método produce la inhibición de la entrada del VIH en la célula;
(c) la célula es un linfocito en un trastorno inflamatorio y el método produce la inhibición de inflamación; o
(d) la célula participa en la vascularización y el método produce la modulación de la angiogénesis.

15. El anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método para modular la expresión de CXCR4 en una célula de un sujeto, en donde:

(a) la célula es una célula tumoral que expresa CXCR4 y el método produce la inhibición del crecimiento de la célula tumoral o la inhibición de la metástasis de la célula tumoral en el sujeto;
(b) la célula es un linfocito T que expresa CXCR4 y el método produce la inhibición de la entrada del VIH en la célula del sujeto;
(c) la célula es un linfocito en un trastorno inflamatorio y el método produce la inhibición de la inflamación en el sujeto; o
(d) la célula participa en la vascularización y el método produce la modulación de la angiogénesis en el sujeto.

16. El anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, para su uso según la reivindicación 15, en donde la célula tumoral se elige de una célula de un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer pancreático, un cáncer de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma, un carcinoma de células renales, un linfoma, un neuroblastoma, un glioblastoma, un rabdomiosarcoma, un cáncer colorrectal, un cáncer de riñón, un osteosarcoma, una leucemia linfoblástica aguda, una leucemia mieloide aguda, un carcinoma de pulmón de células pequeñas y un cáncer de pulmón metastásico.

17. El anticuerpo monoclonal, o la porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de trasplante que comprende estimular la movilización de células madre $CD34^+$ de la médula ósea a la sangre periférica; opcionalmente en el que el método comprende además recoger las células madre $CD34^+$ de la sangre periférica.

VH del Fab anti-CXCR4 F7

```
     Segmento V:       3-48
     Segmento D:      4-23
     Segmento J:       JH6b


      Q   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L
  1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                               CDR1
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   A   G   F   T   F   S   S   Y   S   M   N   W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                                                   CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   Y   I   S   S   R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

                   CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   R   T   I   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA


      D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   D   E   D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                                      CDR3
                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   Y   G   G   Q   P   P   Y   Y   Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

        CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIGURA 1A

VK del Fab anti-CXCR4 F7

Segmento V: L15
Segmento J: JK1

```
     A   I   R   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
  1 GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                          CDR1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                                  CDR2
                                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
    ~~~~~~~
     Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                      CDR3
                                                                    ~~~~~~~
     L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   V   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIGURA 1B

VH del Fab anti-CXCR4 F9

```
   Segmento V:          3-48
   Segmento D:          4-23
   Segmento J:          JH6b


      Q   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L
  1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                                  CDR1
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   A   G   F   T   F   S   S   Y   S   M   N   W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                                                      CDR2
                                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   Y   I   S   S   R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

                  CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   R   S   I   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163 AGT AGA AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA


      D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   D   E   D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                                          CDR3
                                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   Y   G   G   Q   P   P   Y   Y   Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

          CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIGURA 2A

VK del Fab anti-CXCR4 F9

Segmento V: L15
Segmento J: JK1

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
  1 GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                                CDR1
                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                                CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
     ~~~~~~~
      Q   S   G   V   P   P   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA CCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                        CDR3
                                                                       ~~~~~~~
      L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

            CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIGURA 2B

VH del Fab anti-CXCR4 D1

```
Segmento V:          3-48
Segmento D:          4-23
Segmento J:          JH6b
```

```
      E   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L
  1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                            CDR1
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   A   G   F   T   F   S   S   Y   S   M   N   W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                                                CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   Y   I   S   S   R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT CGT

                 CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   K   T   I   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163 AGT AAA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   A   R   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   D   E   D
217 GAC AAT GCC AGG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                                       CDR3
                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   Y   G   G   Q   P   P   Y   Y   Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

         CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIGURA 3A

VK del Fab anti-CXCR4 D1

Segmento V: L15
Segmento J: JK1

```
     V   I   W   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
  1 GTC ATC TGG GTG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                          CDR1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   T   I   T   C   R   T   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W   Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                                CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Q   Q   K   P   E   K   A   P   E   L   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT GAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
    ~~~~~~~
     Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                      CDR3
                                                                    ~~~~~~~
     L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIGURA 3B

VH del Fab anti-CXCR4 E2

Segmento V: 3-48
Segmento D: 4-0.
Segmento J: JH6b

```
     E   V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L
  1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                          CDR1
                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R   L   S   C   A   A   A   G   F   T   F   S   S   Y   S   M   N   W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                                              CDR2
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   Y   I   S   S   R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

                  CDR2
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     S   R   T   I   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA


     D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   D   E   D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                                  CDR3
                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   Y   G   G   Q   P   P   Y   H   Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC CAC TAC

          CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

FIGURA 4A

VK del Fab anti-CXCR4 E2

Segmento V: L15
Segmento J: JK1

```
    E   I   V   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
  1 GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAC AGA

                                  CDR1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   N   W   L   A   W   Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AAC TGG TTA GCC TGG TAT

                                                            CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
    ~~~~~~~
    Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                                                    CDR3
                                                                  ~~~~~~~
    L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TAC TGC CAA CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

FIGURA 4B

Región VH del Fab anti-CXCR4 F7

```
                                                                                          __CDR1____
Línea germinal 3-48   E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W
F7 VH                 Q - - - - Q - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -
F7GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -

                                                   ____________CDR2_______________
Línea germinal 3-48   V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R
F7 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - - - - - - - - -
F7GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                          _______CDR3______
Línea germinal 3-48   D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R
Línea germinal JH6b                                                                         Y Y Y
F7 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - - -
F7GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - - -

                      ___CDR3____
Línea germinal JH6b   Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
F7 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
F7GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
```

FIGURA 5A

Región VK del Fab anti-CXCR4 F7

																													CDR1			
Línea germinal L15	D	I	Q	M	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
F7 VK	A	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																					CDR2											
Línea germinal L15	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
F7 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																													CDR3			
Línea germinal L15	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	Y	N	S
F7 VK	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7GL VK		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Línea germinal L15	Y	P													
Línea germinal JK1				T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	
F7 VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)
F7GL VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)

FIGURA 5B

Región VH del Fab anti-CXCR4 F9

```
                                                                                                                                                                  __CDR1___
Línea germinal 3-48   E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W
F9 VH                 Q - - - - Q - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -
F9GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -

                                                                  ____________CDR2____________
Línea germinal 3-48   V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R
F9 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R S - - - - - - - - - - - - - -
F9GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R S - - - - - - - - - - - - - -

                                                                                                                  ____________CDR3____________
Línea germinal 3-48   D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R
Línea germinal JH6b                                                                                                                                Y Y Y
F9 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - - -
F9GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - - -

                      ___CDR3____
Línea germinal JH6b   Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
F9 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
F9GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
```

FIGURA 6A

Región VK del Fab acnti-CXCR4 F9

																											CDR1					
Línea germinal L15	D	I	Q	M	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
F9 VK	E	-	V	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																			CDR2													
Línea germinal L15	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
F9 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-

																											CDR3					
Línea germinal L15	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	Y	N	S
F9 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Línea germinal L15	Y	P														
Línea germinal JK1				T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K		
F9 VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	
F9GL VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	

FIGURA 6B

Región VH del Fab anti-CXCR4 D1

```
                                                                                  ___CDR1___
Línea germinal 3-48   E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W
D1 VH                 - - - - - Q - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -
D1GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -

                                                    ___________CDR2___________
Línea germinal 3-48   V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R
D1 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - R - K - - - - - - - - - - - - - - - -
D1GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - R - K - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                              _____CDR3_____
Línea germinal 3-48   D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R
Línea germinal JH6b                                                               Y Y Y
D1 VH                 - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - - -
D1GL VH               - - - R - - - - - - -                       - - - - - D Y G G Q P P - - -

                      ___CDR3___
Línea germinal JH6b   Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
D1 VH                 - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
D1GL VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
```

FIGURA 7A

Región VK del Fab anti-CXCR4 D1

																														CDR1			
Línea germinal L15	D	I	Q	M	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
D1 VK	V	-	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
D1GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-

																				CDR2													
Línea germinal L15	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F
D1 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																														CDR3			
Línea germinal L15	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	Y	N	S
D1 VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1GL VK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR3															
Línea germinal L15	Y	P														
Línea germinal JK1				T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K		
D1 VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	
D1GL VK	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	

FIGURA 7B

Región VH del Fab anti-CXCR4 E2

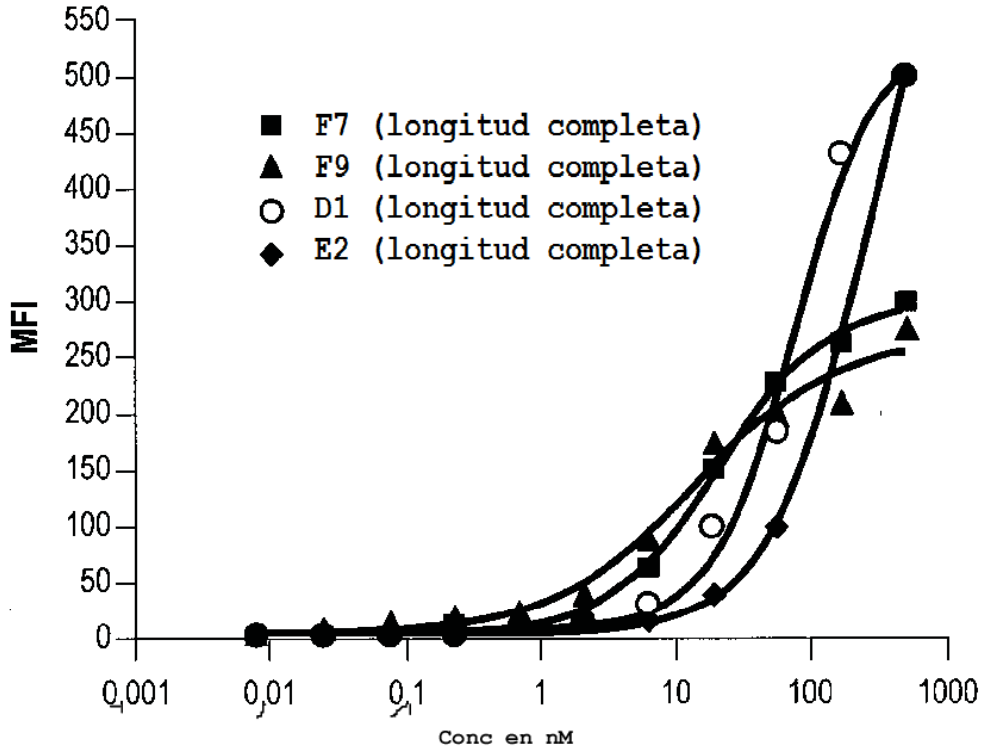
```
                                                                               ___CDR1___
Línea germinal 3-48  E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W
E2 VH                - - - - - Q     - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -
E2GL VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - - - - - - - -

                                                         _______..........CDR2_________
Línea germinal 3-48  V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R
E2 VH                - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - - - - - - - - -
E2GL VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                               _____CDR3_____
Línea germinal 3-48  D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R
Línea germinal JH6b                                                                  Y Y Y
E2 VH                - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - H -
E2GL VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - H -

                     ____CDR3
Línea germinal JH6b  Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
E2 VH                - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
E2GL VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)
```

FIGURA 8A

Región VK del Fab anti-CXCR4 E2

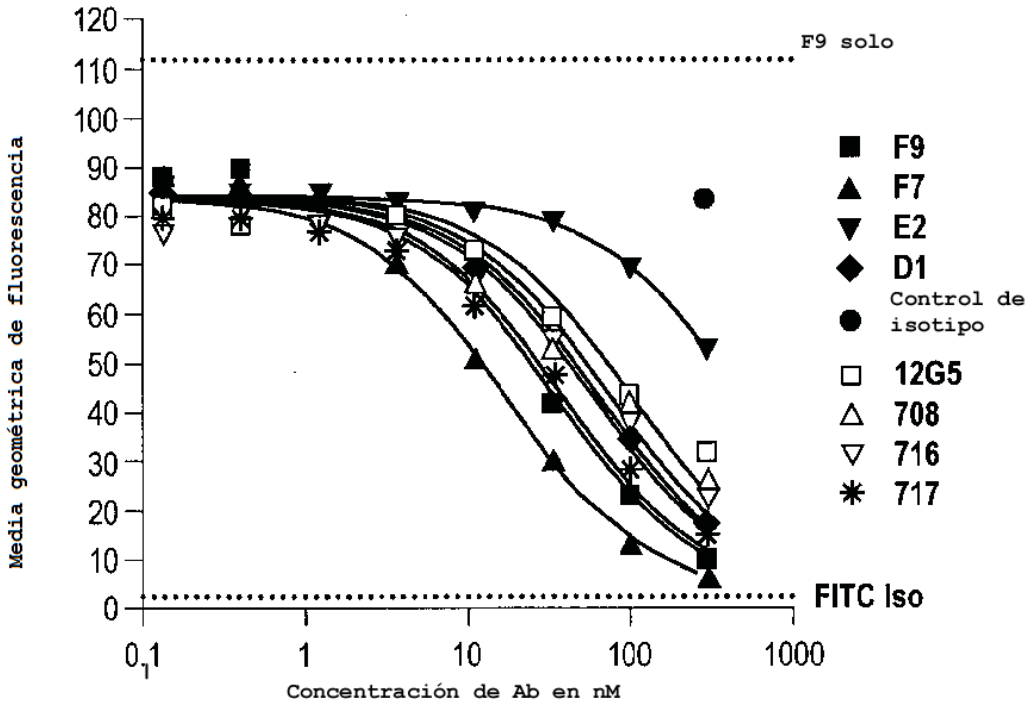
```
                                                                                                                                  CDR1
Línea germinal L15   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
E2 VK                E - V L - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N
E2GL VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N

                                                                                CDR2
Línea germinal L15   W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
E2 VK                - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
E2GL VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                                                                                  CDR3
Línea germinal L15   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 Y N S
E2 VK                - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
E2GL VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                     CDR3
Línea germinal L15   Y P
Línea germinal JK1         T F G Q G T K V E I K
E2 VK                - - R - - - - - - - - - - (JK1)
E2GL VK              - - R - - - - - - - - - - (JK1)
```

FIGURA 8B



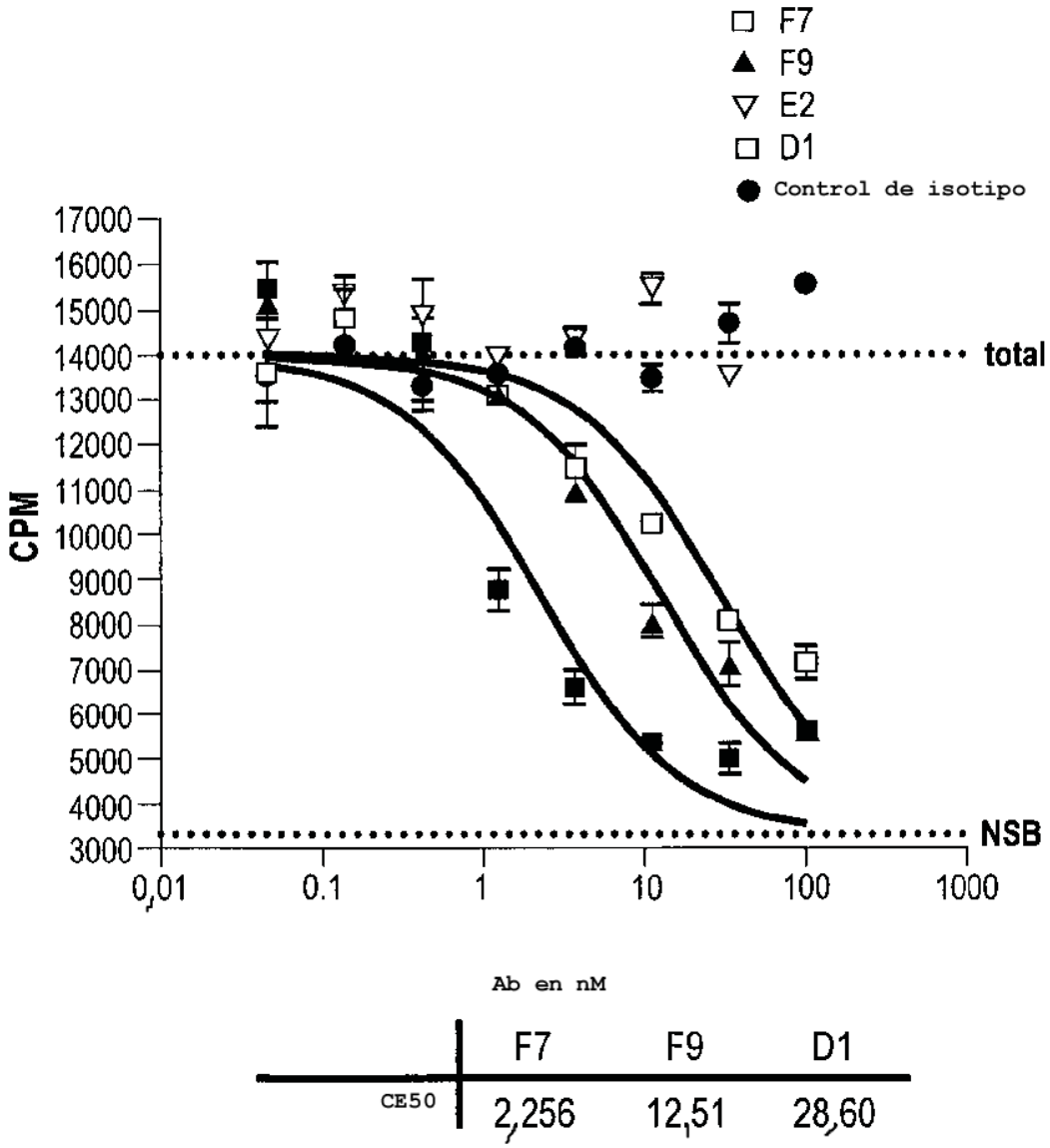
	F7 (longitud completa)	F9 (longitud completa)	D1 (longitud completa)	E2 (longitud completa
CE50	21,11	13,96	79,87	289,8

Figura 9



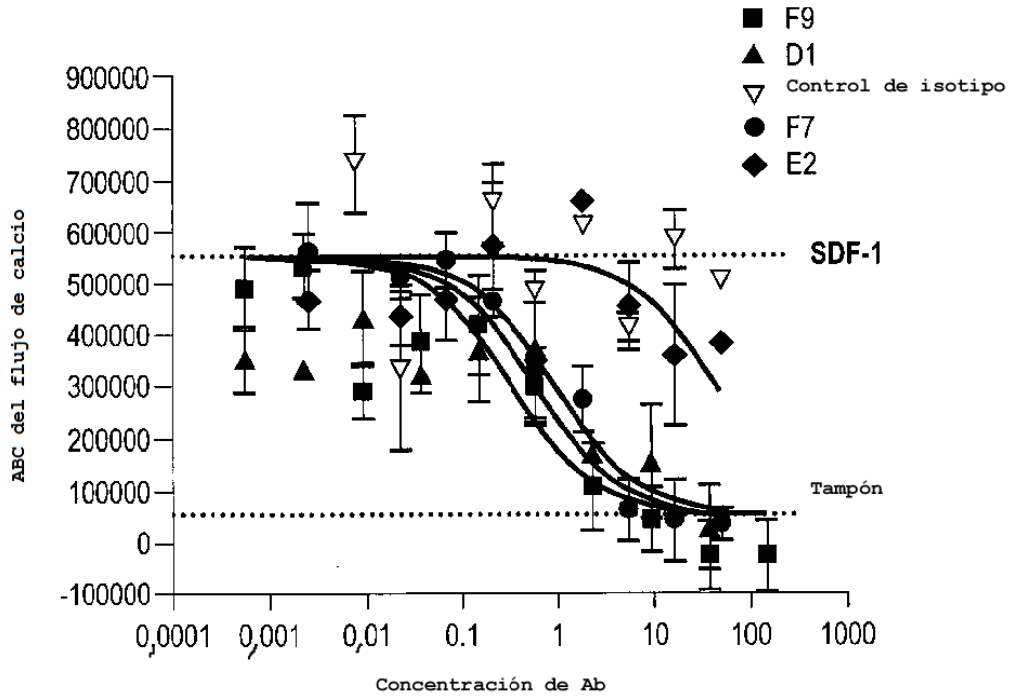
	F9	F7	E2	D1	12G5	708	716	717
CE50	34,39	17,01	468,8	59,17	101,9	76,32	64,68	38,79

Figura 10



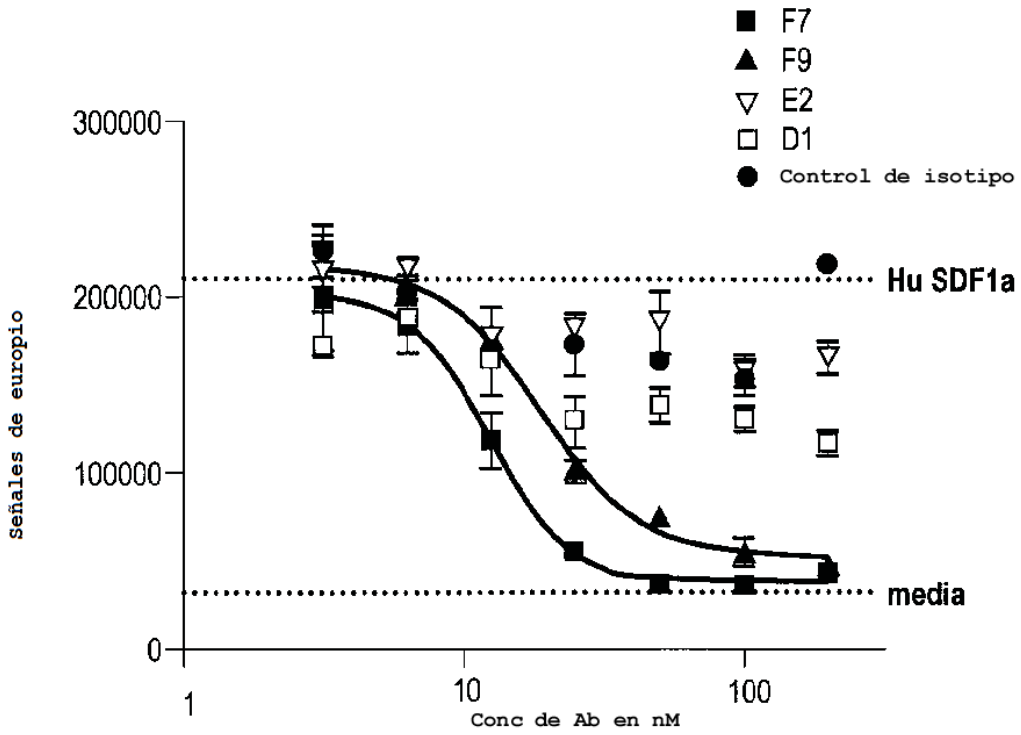
	F7	F9	D1
CE50	2,256	12,51	28,60

Figura 11



	F9	D1	F7	E2
CE50	0,3219	0,5684	0,9046	43,92

Figura 12



	F7	F9
CE50	12,44	18,99

Figura 13

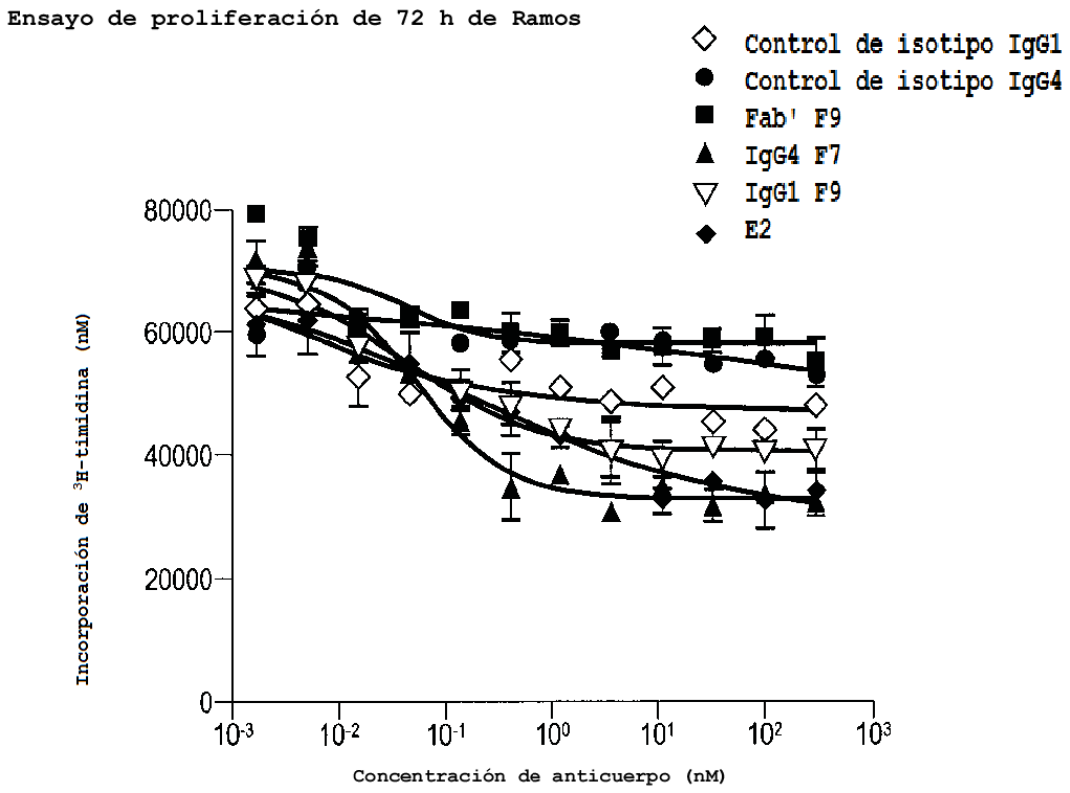

Ensayo de proliferación de 72 h de Ramos
Control de isotipo IgG1
Control de isotipo IgG4
Fab' F9
IgG4 F7
IgG1 F9
E2
80000
60000
40000
20000
0
Incorporación de ³H-timidina (nM)
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
Concentración de anticuerpo (nM)

Figura 14

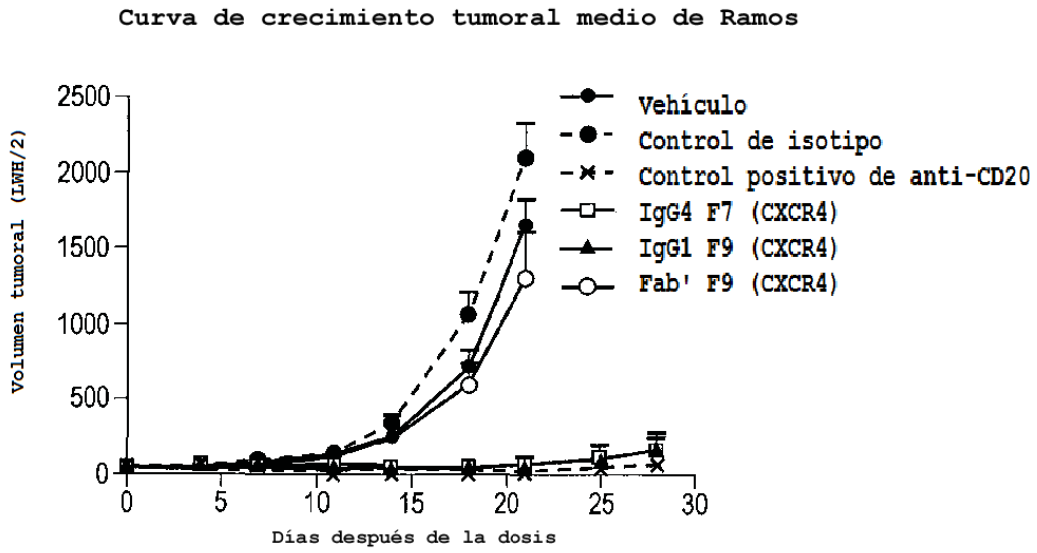


Figura 15A

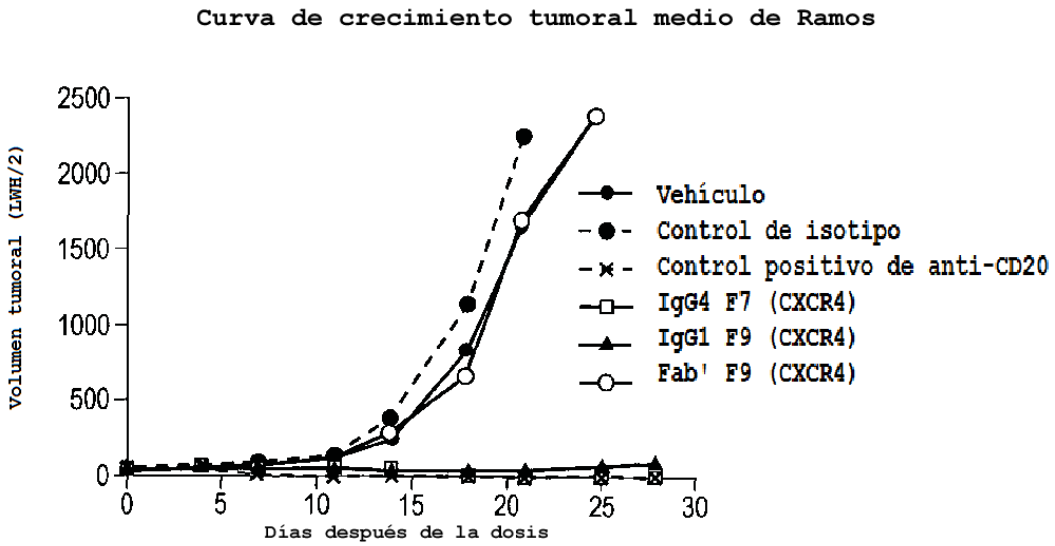


Figura 15B

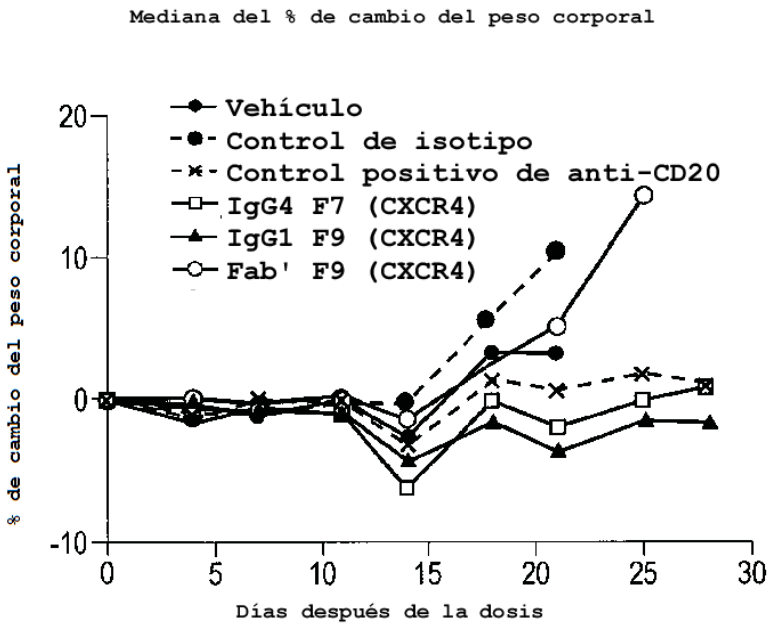


Figura 15C

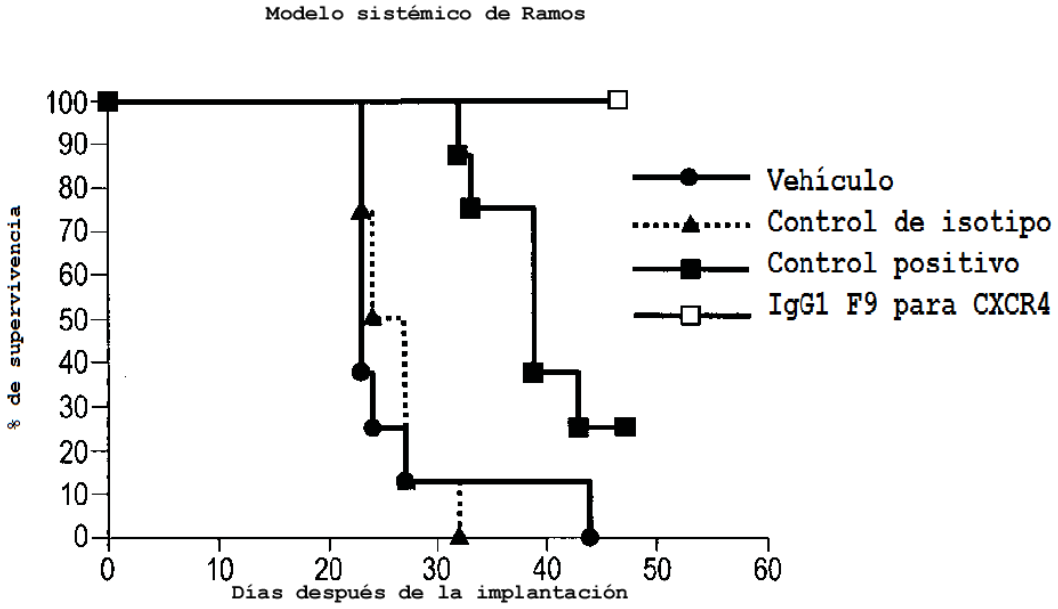


Figura 16