

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 769**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2008 PCT/US2008/074381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2009 WO09032661**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08798744 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2195023**

54 Título: **Anticuerpos anti-CXCR5 humanizados, derivados de los mismos y sus usos**

30 Prioridad:

**29.08.2007 US 968792 P**

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

**18.06.2018**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)  
54, rue La Boétie  
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEE, RENATA;  
MIKOL, VINCENT;  
ALLEN, ELIZABETH;  
RUETSCH, NORMAN;  
CAMERON, BEATRICE;  
OLIGINO, THOMAS y  
BAURIN, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 672 769 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 anti-CXCR5 humanizados, derivados de los mismos y sus usos

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CXCR5 y su uso en la mejora, tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en mamíferos, que incluyen seres humanos, resultantes de la inapropiada actividad o metabolismo de CXCR5, o el inapropiado o inesperado uso del mismo, por un patógeno. Un anticuerpo de interés puede bloquear la interacción de un ligando, tal como CXCL13, con su receptor, tal como CXCR5. También se desvelan composiciones profilácticas, inmunoterapéuticas y de diagnóstico que comprenden los anticuerpos y derivados de los mismos de interés y su uso en métodos de prevención o tratamiento de enfermedades en mamíferos, que incluyen seres humanos, producidas por metabolismo y/o actividad inapropiada de células CXCR5<sup>+</sup>, tales como linfocitos B. Tales enfermedades incluyen deficiencias autoinmunitarias y enfermedades producidas por o caracterizadas por inflamación, tales como artritis reumatoide (AR), donde CXCR5 está regulado por incremento.

## ANTECEDENTES

15 CXCR5, también conocido como el linfoma de Burkitt (BLR1), CD185, MDR15 y MGC117347, es un receptor acoplado a proteína G que es un miembro de la familia de receptores de quimiocina CXC. Un ligando es BLC, también conocido como CXCL13, que es un quimioatrayente de linfocitos B.

El precursor de CXCR5 sin procesar tiene 372 aminoácidos de longitud con un peso molecular de 42 K<sub>D</sub>.

20 CXCR5 tiene una función en la migración y localización de linfocitos B dentro de compartimentos anatómicos particulares. Los ratones inactivados carecen de ganglios linfáticos periféricos, tienen menos parches de Peyer y tienen niveles reducidos de linfocitos B.

La identificación, clonación y secuenciación de una quimiocina CXC, llamada la quimiocina 1 atrayente de linfocitos B (BCA-1), que es quimiotáctica para linfocitos B humanos mediante BLR1 (conocido de otro modo como CXCR5), se ha descrito por Legler et al., 1998, J. Exp. Med. 187(4): 655-60. Legler et al. no desvelan ningún anticuerpo, y mucho menos un anticuerpo contra CXCR5 específico.

25 Spinetti et al., 2001, Biochem. Biophys. Res. Commun. 289(1): 19-24, desvelan que CXCL13 - conocido de otro modo como quimiocina 1 atrayente de linfocitos B (BCA-1) o como quimioatrayente de linfocitos B (BLC) - que se sabe que es el ligando del receptor de quimiocina CXCR5, desplaza la unión de FGF-2 a células endoteliales, inhibe la homodimerización de FGF-2 e induce la formación de heterodímeros CXCL13-FGF-2.

30 El documento US 2005/0276812 A1 (Carter et al.) se refiere a varios conjugados anticuerpo-fármaco que incluyen uno en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-CXCR5.

Schmutz et al., 2005, Arthritis Res. Ther. 7(2): R217-29, se refiere al uso de anticuerpo monoclonal anti-CXCR5 humano en el ensayo de inmunohistoquímica para CXCR5.

El documento US5.821.337 se refiere a anticuerpos humanizados y un método de preparación de los mismos, pero no desvela ningún anticuerpo contra CXCR5 específico.

## 35 SUMARIO

La presente invención proporciona novedosos anticuerpos humanizados y humanos, y fragmentos y derivados de los mismos, que se unen específicamente a CXCR5. Algunos de los anticuerpos, y fragmentos de unión a CXCR5 de los mismos, pueden alterarse para prevenir la formación de enlaces disulfuro intracatenarios que produce una molécula que es estable mediante fabricación y uso *in vivo*. Otros anticuerpos de interés pueden alterarse para minimizar la unión a FCR. Algunos anticuerpos contra CXCR5 de interés compiten con CXCL13 para unirse a CXCR5. Otros anticuerpos disminuyen la actividad de CXCR5.

La invención incluye las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de los anticuerpos y sus correspondientes secuencias de ácidos nucleicos.

45 Otra realización de la invención incluye las secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos para obtener moléculas de unión que comprenden una o más regiones CDR, o regiones derivadas de CDR, que retienen la capacidad de unión a CXCR5 de la molécula parental de la que se obtuvo (obtuvieron) CDR.

Un anticuerpo de interés puede ser uno que previene que CXCL13, u otro ligando, se una a células CXCR5<sup>+</sup>, tales como linfocitos B.

50 Otra realización de la presente invención incluye las líneas celulares y vectores que alojan las secuencias de anticuerpos de la presente invención.

Otra realización de la presente invención es el uso de los anticuerpos para la preparación de un medicamento o composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados a la función y metabolismo de CXCR5.

Otra realización de la presente invención es el uso de estos anticuerpos en el tratamiento de trastornos asociados a la biología y función de CXCR5 atípica o anormal.

- 5 Características y ventajas adicionales se describen en el presente documento, y serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, vectores o reactivos descritos en el presente documento, debido a que pueden variar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Además, la terminología usada en el presente documento es con el fin de ejemplificar realizaciones particulares solo y no pretende limitar el alcance de la presente invención. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos, y cualquier acrónimo usado en el presente documento, tienen los mismos significados que comúnmente son entendidos por un experto habitual en la materia en el campo de la invención.

15 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en el presente documento están describiendo y desvelando proteínas, enzimas, vectores, células hospedadoras y metodologías que podrían usarse con y en la presente invención. Sin embargo, nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tenga derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de la invención previa.

Antes de enseñar la preparación y uso de los métodos relacionados con CXCR5 y productos de interés, se proporcionan las siguientes definiciones no limitantes de algunos términos y expresiones para guiar al experto.

20 "CXCR5" se refiere a la molécula conocida que existe de forma natural encontrada en linfocitos, particularmente linfocitos B, y particularmente linfocitos B intactos; a una molécula tal aislada de tales células; a una molécula tal fabricada recombinantemente usando materiales y medios conocidos, y usando un ácido nucleico que codifica un CXCR5; además de a porciones de CXCR5, tales como el dominio extracelular (EC), que retiene las características y propiedades relevantes para la práctica de la presente invención, tales como unión a CXCL13. Una molécula  
25 CXCR5 soluble puede consistir esencialmente en el dominio EC de CXCR5, que incluye, generalmente, aproximadamente los primeros sesenta aminoácidos de la molécula, es decir, la porción del extremo amino de CXCR5.

30 CXCR5 es un receptor no promiscuo. CXCL13 es un ligando de CXCR5 y se expresa constitutivamente en células del estroma, tales como células dendríticas foliculares, y en tejidos linfoides. CXCL13 atrae específicamente a linfocitos B y un pequeño subconjunto de linfocitos T llamado linfocitos T foliculares cooperadores B, TFH. Eso puede no ser imprevisible dadas las muchas interacciones entre poblaciones de linfocitos T y linfocitos B en el sistema inmunitario. Además, el linfocito T activado induce o regula por incremento la expresión de CXCR5. Se ha encontrado que la infiltración de linfocitos en centros germinales (GC) ectópicos terciarios se correlaciona bien con la elevada gravedad de la enfermedad y ruptura de la tolerancia en ciertos trastornos que presentan tales estructuras  
35 atípicas de tipo ganglio linfático. Usando modelos murinos *in vivo*, tales como ratones CXCR5<sup>-/-</sup> y CXCL13<sup>-/-</sup>, la ausencia de cualquiera del receptor o el ligando produce una arquitectura fina de GC alterada debido a la localización alterada de linfocitos T y B, y posiblemente interacción. Estos ratones también se protegen contra el desarrollo de artritis inducida por colágeno (CIA) grave. Como CXCR5 se expresa selectivamente en linfocitos B maduros, que están unidos a la patogénesis de AR, el bloqueo de este receptor modulará la respuesta artritogénica en individuos afectados. El tratamiento de artritis reumatoide con agentes biológicos (es decir, anticuerpos anti-TNF $\alpha$  y anti-CD20, Rituximab) ha mostrado ser clínicamente eficaz; en particular, pacientes con terapia dirigida a linfocitos B han mostrado mejoras de larga duración en signos clínicos y síntomas. El direccionamiento selectivo de CXCR5, que solo se expresa en linfocitos B y linfocitos T cooperadores B maduros, no afectará el desarrollo de linfocitos B o inmunocomprometerá al paciente. A diferencia de Rituximab, un presente anticuerpo es un anticuerpo neutralizante  
45 que no media en la citotoxicidad celular.

Una "enfermedad por CXCR5" es una dolencia, trastorno, enfermedad, afección, anomalía, etc., que se caracteriza por o se produce por la expresión en exceso o niveles elevados de CXCL13 u otro ligando de CXCR5, elevados niveles de linfocitos B, elevados niveles de actividad de linfocitos B, elevados niveles de CXCR5 o metabolismo y actividad inapropiados de CXCR5.

50 Por "actividad de linfocitos B" se indica superior a los niveles de linfocitos B normales, que puede ser local, o evidencia de una manifestación o función biológica de un linfocito B, tal como expresión de anticuerpos, presencia o actividad de tirosina cinasa de Bruton, expresión o presencia de CD19, expresión o presencia de factor activante de linfocitos B, etc.

55 La expresión "sustancialmente idéntico" con respecto a una secuencia de polipéptidos de la cadena de anticuerpo puede interpretarse como una cadena de anticuerpo que presenta al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de polipéptidos de referencia. El término con respecto a una secuencia de

ácidos nucleicos puede interpretarse como una secuencia de nucleótidos que presenta al menos aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos de referencia.

Los términos "identidad" u "homología" pueden significar el porcentaje de bases de nucleótidos o restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos al resto de una secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad para la secuencia entera, y no considerando sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones del extremo N o extremo C ni las inserciones deben interpretarse como que reduzcan la identidad u homología. Están disponibles métodos y programas informáticos para el alineamiento y son muy conocidos en la técnica. La identidad de secuencia puede medirse usando software de análisis de secuencias.

Las expresiones y términos "fragmento funcional, variante, derivado o análogo", y similares, además de formas de los mismos, de un anticuerpo o antígeno es un compuesto o molécula que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa o antígeno de interés. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-CXCR5 es uno que puede unirse a una molécula de CXCR5 o uno que puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad de un ligando, tal como CXCL13, o un anticuerpo agonista o antagonista, para unirse a CXCR5. Un ejemplo es una molécula scFv. En cuanto a CXCR5, una variante o derivado del mismo es una molécula que no es idéntica a un CXCR5 que existe de forma natural e incluso puede usarse para un fin de la presente invención, tal como, aunque no es idéntico a CXCR5 no mutado, sin embargo, puede usarse como inmunogén para producir anticuerpos que se unen selectivamente a CXCR5 no mutado.

Variantes "sustitucionales" son aquellas que tienen al menos un resto de aminoácido en una secuencia nativa eliminada y sustituida con un aminoácido diferente insertado en su sitio en la misma posición. Las sustituciones pueden ser únicas, donde solo un aminoácido en las moléculas está sustituido, o pueden ser múltiples, donde dos o más aminoácidos están sustituidos en la misma molécula. Sustituciones plurales pueden ser en sitios consecutivos. Por tanto, puede sustituirse un aminoácido con restos plurales, en cuyo caso una variante tal comprende tanto una sustitución como una inserción. Variantes de "inserción" son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en una secuencia nativa. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado a cualquiera del grupo funcional  $\alpha$ -carboxilo o  $\alpha$ -amino del aminoácido. Variantes de "delección" son aquellas con uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos nativa eliminada. Generalmente, las variantes de delección tendrán uno o dos aminoácidos delecionados en una región particular de la molécula.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y específicamente cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos o polipéptidos sintéticos que llevan una o más secuencias de CDR o de derivadas de CDR, mientras que los polipéptidos presentan la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) e inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Generalmente, los anticuerpos se consideran Ig con una especificidad definida o reconocida. Así, mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad por diana. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, etc.), o subclase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, etc.) ("tipo" y "clase", y "subtipo" y "subclase", se usan indistintamente en el presente documento). Nativos o no mutados, es decir, obtenido de un miembro no artificialmente manipulado de una población, los anticuerpos e inmunoglobulinas son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en el otro extremo. Por "no artificialmente manipulado" se indica no tratado para contener o expresar una molécula de unión al antígeno extraña. No mutado puede referirse al alelo más predominante o especie encontrada en una población o al anticuerpo obtenido a partir de un animal no manipulado, en comparación con un alelo o polimorfismo, o una variante o derivado obtenido por una forma de manipulación, tal como mutagénesis, uso de métodos recombinantes, etc., para cambiar un aminoácido de la molécula de unión al antígeno.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo anti-CXCR5" significa un anticuerpo o polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente a CXCR5 humano como se define en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de CXCR5 a sus ligandos o inhiben la actividad de CXCR5.

El término "variable", en el contexto de un dominio variable de anticuerpos, se refiere a ciertas porciones de la molécula relevante que se diferencian ampliamente en la secuencia entre dos y entre varios anticuerpos y se usan en el reconocimiento específico y la unión de un anticuerpo particular por su diana particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. La variabilidad se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), también conocidas como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman

las regiones o secuencias de la región estructural (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja  $\beta$ , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas frecuentemente en proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión diana (epítotope o determinante) de los anticuerpos (véase Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Como se usa en el presente documento, la numeración de restos de aminoácidos de inmunoglobulina se hace según el sistema de numeración de restos de aminoácidos de inmunoglobulina de Kabat et al., a menos que se indique lo contrario. Una CDR puede llevar la capacidad de unirse específicamente al epítotope relacionado.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de una cadena intacta o de longitud completa o un anticuerpo, generalmente la región de unión diana o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  y  $F_v$ . Un "fragmento funcional" o "análogo de un anticuerpo anti-CXCR5" es uno que puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor para unirse a un ligando o para iniciar la señalización. Como se usa en el presente documento, fragmento funcional generalmente es sinónimo de "fragmento de anticuerpo" y, con respecto a anticuerpos, puede referirse a fragmentos tales como  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab)2}$ , etc., que pueden prevenir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor para unirse a un ligando o para iniciar la señalización. Un fragmento " $F_v$ " consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y una ligera en una asociación no covalente (dímero  $V_H-V_L$ ). En esa configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión diana sobre la superficie del dímero  $V_H-V_L$ , como en un anticuerpo intacto. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión diana en el anticuerpo intacto. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un  $F_v$  que comprende solo tres CDR específicas para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y de unirse a la diana.

Fragmentos " $F_v$  de cadena única", " $sF_v$ " o " $scAb$ " de anticuerpos comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos única. Generalmente, el polipéptido  $F_v$  comprende además un conector polipeptídico, frecuentemente una molécula flexible, entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , que permite que  $sF_v$  forme la estructura deseada para la unión a diana.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que pueden comprender un dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) en la cadena de polipéptidos. Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios variables en la misma cadena, los dominios de diacuerpo son forzados a emparejarse con los dominios de unión de otra cadena para crear dos sitios de unión al antígeno.

El fragmento  $F_{ab}$  contiene los dominios variables y constantes de la cadena ligera y el dominio variable y primer constante ( $C_{H1}$ ) de la cadena pesada. Los fragmentos  $F_{ab}'$  se diferencian de los fragmentos  $F_{ab}$  mediante la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio  $C_{H1}$  para incluir una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, los fragmentos  $F_{ab}'$  pueden producirse por escisión del enlace disulfuro en las cisteínas bisagra del producto de digestión con pepsina  $F_{(ab)2}$ . Tratamientos enzimáticos y químicos adicionales de anticuerpos pueden dar otros fragmentos funcionales de interés.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

Anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular (tipo o subtipo), con el resto de la(s) cadena(s) idéntica(s) a u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada de unión a CXCR5 o que afectan la actividad o metabolismo de CXCR5 (patente de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). Así, las CDR de una clase de anticuerpo pueden injertarse en la FR de un anticuerpo de clase o subclase diferente.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio diana, epítotope o determinante. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítotospes) de un antígeno, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosamente sintetizados por una célula hospedadora sin contaminar por otras inmunoglobulinas, y proporciona clonación del gen relevante y ARNm que codifica el anticuerpo o cadenas del mismo. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso con la presente invención pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando técnicas muy conocidas, o pueden purificarse de una preparación

policlonal. Los anticuerpos monoclonales parentales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos recombinantes muy conocidos en la técnica.

5 Formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  u otras subsecuencias de unión a diana de los anticuerpos) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de molde de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina ( $F_c$ ), normalmente la del molde de inmunoglobulina humana elegido. En general, el objetivo es tener una molécula de anticuerpo que sea mínimamente inmunogénica en un humano. Así, es posible que uno o más aminoácidos en una o más CDR también puedan cambiarse con uno que sea menos inmunogénico para un hospedador humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de la una o más CDR a CXCR5 o a CXCL13. Alternativamente, la FR puede ser no humana, pero aquellos aminoácidos más inmunogénicos se sustituyen con otros menos inmunogénicos. Sin embargo, el injerto de CDR, como se trata anteriormente, no es la única forma para obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, modificar solo las regiones CDR puede ser insuficiente, ya que no es raro que los restos de la región estructural tengan una función en determinar la estructura tridimensional de los bucles de CDR y la afinidad global del anticuerpo por su ligando. Por tanto, cualquier

La respuesta inmunitaria adaptativa tiene dos brazos importantes: la respuesta inmunitaria celular de linfocitos T y la respuesta inmunitaria humoral de anticuerpo que secretan linfocitos B. Los epítopes de linfocito B pueden ser lineales, aminoácidos contiguos, o pueden ser conformacionales (*Protein Science* (2005) 14, 246). A diferencia, los epítopes de linfocito T son péptidos lineales cortos que se escinden de proteínas antigénicas que se presentan en el contexto de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o, en el caso de seres humanos, moléculas de clase I o clase II del antígeno leucocitario humano (HLA). La presentación de epítopo depende de tanto la unión al péptido MHC como las interacciones con el receptor de linfocitos T (TCR). Las proteínas MHC son altamente polimórficas, y cada una se une a un conjunto limitado de péptidos. Así, la combinación particular de alelos de MHC presentes en un hospedador limita el intervalo de posibles epítopes reconocidos durante una infección.

30 Se distinguen dos tipos fundamentales de linfocitos T por la expresión de proteínas CD8 y CD4, que imponen si un linfocito T reconocerá epítopes presentados por moléculas de clase I o clase I, respectivamente. Los epítopes T  $CD4^+$  son procesados después de la encapsulación por células presentadoras de antígenos en vesículas unidas a membrana, donde el antígeno es degradado por proteasas en fragmentos de péptido que se unen a proteínas de la clase II de MHC. A diferencia, los linfocitos T  $CD8^+$  generalmente reconocen antígenos virales o auto-antígenos expresados desde dentro de una célula, proteínas que se escinden en péptidos cortos en el citosol por el inmunoproteasoma. Después de la escisión, los péptidos son translocados por el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) dentro del retículo endoplásmico para la carga sobre los antígenos HLA I. Los epítopes de linfocitos T (cooperadores)  $CD4^+$  son críticos en la conducción de las respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T a antígenos de proteína.

40 Un método de humanización de interés se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmunitario. La flexibilidad de la proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de la proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o un único resto de aminoácido para adoptar un conjunto de conformaciones que se diferencian significativamente entre sí. Información sobre la flexibilidad de la proteína puede obtenerse realizando experimentos de cristalografía de rayos X de proteínas (véase, por ejemplo, Kundu et al. 2002, *Biophys J* 83:723-732), experimentos de resonancia magnética nuclear (véase, por ejemplo, Freedberg et al., *J Am Chem Soc* 1998, 120(31):7916-7923) o realizando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación de MD de una proteína se hace en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína durante un periodo de tiempo calculando las interacciones físicas de los átomos entre sí. La salida de la simulación de MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el periodo de tiempo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de proteína, también llamadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el periodo de la simulación, por ejemplo cada 1 picosegundo (ps). Es analizando el conjunto de instantáneas que puede cuantificarse la flexibilidad de los restos de aminoácidos de la proteína. Así, un resto flexible es uno que adopta un conjunto de diferentes conformaciones en el contexto del polipéptido dentro del que reside el resto. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Varios software permiten simulaciones de MD, tales como Amber (véase Case et al. (2005) *J Comp Chem* 26:1668-1688), Charmm (véanse Brooks et al. (1983) *J Comp Chem* 4:187-217; y MacKerell et al. (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo et al. *J Am Chem Soc*; 2000; 122(51): 12898-12900).

60 La mayoría de los complejos de proteína comparten una superficie enterrada relativamente grande y plana y se ha mostrado que la flexibilidad de los componentes de unión proporciona el origen para su plasticidad, que les permite que se adapten conformacionalmente entre sí (*Structure* (2000) 8, R137-R142). Como tal, se ha mostrado que

ejemplos de "ajuste inducido" desempeñan una función dominante en las interfases proteína-proteína. Además, hay un conjunto de datos cada vez mayor que muestran que las proteínas se unen en realidad a ligandos de diversas formas, tamaños y composición (Protein Science (2002) 11:184-187) y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad para reconocer diferentes componentes (Science (2003) 299, 1362-1367).  
5 Restos flexibles participan en la unión de componentes proteína-proteína (Structure (2006) 14, 683-693).

Los restos flexibles pueden adoptar una variedad de conformaciones que proporcionan un conjunto de áreas de interacción que es probable que sean reconocidas por linfocitos B de memoria y desencadenen una respuesta inmunogénica. Así, el anticuerpo puede humanizarse modificando varios restos de la región estructural de manera que el conjunto de conformaciones y de áreas de reconocimiento presentadas por el anticuerpo modificado se parezcan en la medida de lo posible a aquellas adoptadas por un anticuerpo humano.  
10

Eso puede lograrse modificando un número limitado de restos: (1) construyendo un modelo de homología del mAb parental y ejecutando una simulación de MD; (2) analizando los restos flexibles e identificación de los restos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humano, además de identificando restos o motivos que probablemente sean una fuente de heterogeneidad o de reacción de degradación; (3) identificando un anticuerpo humano que muestra el conjunto más similar de áreas de reconocimiento que el anticuerpo parental; (4) determinando los restos flexibles que van a mutarse, también son mutados restos o motivos que probablemente son una fuente de heterogeneidad y degradación; y (5) comprobando la presencia de epítopes de linfocitos T o linfocitos B conocidos. Los restos flexibles pueden encontrarse usando un cálculo de MD como se enseña en el presente documento usando un modelo de disolvente implícito, que explica la interacción del disolvente de agua con los átomos de la proteína durante el periodo de tiempo de la simulación.  
15  
20

Una vez se ha identificado el conjunto de restos flexibles dentro de las cadenas ligeras y pesadas variables, se identifica un conjunto de regiones estructurales de la región variable de la cadena pesada y ligera humana que se parecen estrechamente a las del anticuerpo de interés. Esto puede hacerse, por ejemplo, usando una búsqueda de blast en el conjunto de restos flexibles frente a una base de datos de secuencias de la línea germinal de anticuerpos humanos. También puede hacerse comparando la dinámica del mAb parental con la dinámica de una biblioteca de estructuras canónicas de la línea germinal. Los restos de CDR y los restos vecinos se excluyen de la búsqueda para garantizar que se preserve la alta afinidad por el antígeno.  
25

Así, se realizó una comparación de la trayectoria de dinámica molecular del anticuerpo de interés con las trayectorias de una biblioteca de estructuras de anticuerpo de la línea germinal. 16D7 se comparó con una biblioteca de 49 estructuras de la línea germinal. La trayectoria de dinámica molecular retenida de cada anticuerpo es un conjunto de cálculos de dinámica molecular durante la simulación informática de dinámica molecular donde, por ejemplo, se usan aproximadamente 10 conformaciones diversas como diversos puntos de partida, y para cada punto de partida, se ejecutan aproximadamente 10 simulaciones de dinámica molecular. Se construyeron 49 modelos de homología 3D de las líneas germinales de anticuerpo humano combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes (vk1, vk2, vk3, vk4, v1, v1A2 y v1A3) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5 y vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, edición de base de datos D593-D597). Los restos flexibles de 16D7 se cambian entonces a los restos correspondientes de la estructura de la línea germinal con una trayectoria más próxima a la del anticuerpo de interés.  
30  
35

Entonces se sustituyen los restos flexibles. Cuando varios restos humanos muestran homología similares, la selección también es conducida por la naturaleza de los restos que es probable que afecte el comportamiento en disolución del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, se preferirán restos polares en bucles flexibles expuestos con respecto a restos hidrófobos. Los restos que son una posible fuente de inestabilidad y heterogeneidad también son mutados, aunque se encuentren en las CDR. Esto incluirá metioninas expuestas, ya que la formación de sulfóxido puede resultar de radicales de oxígeno, escisión proteolítica de enlaces lábiles en ácidos tales como aquellos del dipéptido Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), sitios de desamidación encontrados con un resto de asparagina expuesto seguido de un aminoácido pequeño, tal como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43) y sitios de N-glucosilación, tales como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Normalmente, las metioninas expuestas serán sustituidas con una Leu, las asparaginas expuestas serán sustituidas con una glutamina o con un aspartato, o se cambiará el resto posterior. Para el sitio de glucosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiará cualquiera del resto Asn o Ser/Thr.  
40  
45  
50

La secuencia compuesta resultante se comprueba para la presencia de epítopes de linfocitos B o linfocitos T lineales conocidos. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con Immune Epitope Data Base (IEDB) públicamente disponible (PLos Biol (2005) 3(3)e91). Si se encuentra un epítipo conocido dentro de la secuencia compuesta, se recupera otro conjunto de secuencias humanas y se sustituye

A diferencia del método de acondicionamiento superficial de la patente de EE.UU. N.º 5.639.641, tanto las respuestas inmunogénicas mediadas por linfocitos B como mediadas por linfocitos T son tratadas por el método. El método también evita el problema de pérdida de actividad que es algunas veces observada con el injerto de CDR (patente de EE.UU. N.º 5.530.101). Además, también se consideran problemas de estabilidad y solubilidad en el proceso de ingeniería y selección, produciendo un anticuerpo que se optimiza para baja inmunogenicidad, alta afinidad por antígeno y propiedades biofísicas mejoradas.  
55  
60

Estrategias y métodos para acondicionar superficialmente los anticuerpos, y otros métodos de reducción de la inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un hospedador diferente, se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.639.641. Brevemente, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posición de un conjunto de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo para dar posiciones expuestas en la superficie de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligera, en el que las posiciones de alineamiento para todas las regiones variables son al menos aproximadamente el 98 % idénticas, (2) se define un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligera para un anticuerpo no humano, tal como de un roedor (o fragmento del mismo); (3) se identifica un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligera que es el más estrechamente idéntico al conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de roedor; y (4) el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligera definidos en la etapa (2) se sustituye con el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligera identificado en la etapa (3), excepto aquellos restos de aminoácidos que están dentro de 5Å de cualquier átomo de cualquier resto de un CDR del anticuerpo de roedor, para dar un anticuerpo humanizado, tal como de un roedor, que retiene la especificidad de unión.

Los anticuerpos pueden humanizarse mediante una variedad de otras técnicas que incluyen injerto de CDR (documentos EPO 0 239 400; WO 91/09967; y las patentes de EE.UU. N.º 5.530.101 y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento superficial (documentos EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, *Molec Imm* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Prot Eng* 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973) y barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332). Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, métodos de presentación en fagos, véanse las patentes de EE.UU. N.º 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, usando animales transgénicos, tales como roedores, usando células quiméricas, etc.

"Homólogo de anticuerpo" u "homólogo" se refiere a cualquier molécula que se une específicamente a CXCR5 como se enseña en el presente documento. Así, un homólogo de anticuerpo incluye anticuerpo nativo o recombinante, tanto modificado como no, porciones de anticuerpos que retienen las propiedades biológicas de interés, tales como unión a CXCR5, tales como una molécula  $F_{ab}$  o  $F_v$ , un anticuerpo monocatenario, un polipéptido que lleva una o más regiones CDR, etc. La secuencia de aminoácidos del homólogo no necesita ser idéntica a la del anticuerpo que existe de forma natural, pero puede alterarse o modificarse para llevar aminoácidos sustituidos, aminoácidos insertados, aminoácidos deletados, aminoácidos distintos de los veinte normalmente encontrados en proteínas, etc., para obtener un polipéptido con propiedades potenciadas u otras beneficiosas.

Anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencias con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo contra CXCR5 de la presente invención. Preferentemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de un anticuerpo de la presente invención. "Homología de secuencias", como se aplica a una secuencia de aminoácidos en el presente documento, se define como una secuencia con al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o más de homología de secuencias, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología de secuencias con otra secuencia de aminoácidos, como se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA según Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444-2448 (1988).

Un anticuerpo quimérico es uno con diferentes porciones de un anticuerpo derivado de diferentes fuentes, tales como diferentes anticuerpos, diferentes clases de anticuerpo, diferentes especies de animal, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino emparejado con una región constante de inmunoglobulina humana, etc. Así, un anticuerpo humanizado es una especie de anticuerpo quimérico. Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos quiméricos, véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J Immunol Methods* 125:191-202; y las patentes de EE.UU. N.º 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

Los anticuerpos artificiales incluyen anticuerpos monocatenarios, fragmentos scFv, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (véanse la revisión por Winter & Milstein, 1991, *Nature* 349:293-299; y Hudson, 1999, *Curr Opin Imm* 11:548-557), cada uno con capacidad de unión al antígeno o de unión al epítipo. En el fragmento  $F_v$  monocatenario (scFv), los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo están unidos por un péptido flexible. Normalmente, el conector es un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos. Si el conector es mucho más pequeño, por ejemplo, 5 aminoácidos, se forman diacuerpos, que son dímeros de scFv bivalentes. Si el conector se reduce a menos de tres restos de aminoácidos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se llaman triacuerpos y tetracuerpos, respectivamente. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo puede ser una CDR única, normalmente la CDR2 o 3 de la cadena pesada que tiene capacidad de reconocimiento y de unión específica suficiente, pero puede ser cualquier combinación de secuencias de CDR como puede determinarse poniendo en práctica los métodos enseñados en el presente documento. Un fragmento tal se llama una unidad de reconocimiento molecular o mru. Pueden unirse varios de tales mru juntos con péptidos de conector corto, formando así una proteína de unión artificial con avidez más alta que una sola mru.



También están incluidos dentro del alcance de la invención equivalentes funcionales de un anticuerpo de interés. El término "equivalentes funcionales" incluye

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplos, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, desamidación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular, enlace a una toxina o resto citotóxico u otra proteína, etc. La unión covalente no necesita dar un anticuerpo que es inmune a generar una respuesta antiidiotípica. Las modificaciones pueden lograrse por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica, etc. Adicionalmente, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Están disponibles muchas técnicas para un experto habitual en la materia que permiten la optimización de la afinidad de unión. Normalmente, las técnicas implican la sustitución de diversos restos de aminoácidos en el sitio de interés, seguido de un análisis de cribado de la afinidad de unión del polipéptido mutante para el antígeno o epítipo relacionado.

Una vez se identifica y aísla el anticuerpo, es frecuentemente útil generar un anticuerpo de variante o mutante, o muteína, en el que uno o más restos de aminoácidos están alterados, por ejemplo, en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo. Alternativamente, o además, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de restos de la región estructural en el anticuerpo donde éstas producen una mejora en la afinidad de unión del anticuerpo mutante por CXCR5. Ejemplos de restos de la región estructural que pueden modificarse incluyen aquellos que se unen no covalentemente al antígeno directamente (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); interaccionan con/afectan la conformación de una CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); y/o participan en la interfase  $V_L$ - $V_H$  (EP 239 400). En ciertas realizaciones, las modificaciones de uno o más de tales restos de la región estructural producen un potenciamiento de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno relacionado. Por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente cinco restos de la región estructural pueden alterarse en esta realización de la invención. Algunas veces, esto puede ser suficiente para dar un anticuerpo mutante adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso donde ninguno de los restos de la región hipervariable han sido alterados. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo mutante puede comprender una o más alteración (alteraciones) de la región hipervariable. Las regiones constantes también pueden alterarse para obtener propiedades efectoras deseables o más deseables.

Los restos de la región hipervariable que son alterados puede ser cambiados al azar, especialmente donde la afinidad de unión inicial del anticuerpo parental sea tal que los mutantes de anticuerpo aleatoriamente producidos puedan ser fácilmente cribados para unión alterada en un ensayo como se enseña en el presente documento.

Un procedimiento para obtener anticuerpo mutantes, tales como mutantes de CDR, es la "mutagénesis por cribado de alanina" (Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989); y Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). Uno o más del (de los) resto(s) de la región hipervariable son sustituidos con resto(s) de alanina o polialanina. Aquel (Aquellos) resto(s) de la región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo mutaciones adicionales u otras en o para los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita estar predeterminada. Pueden intentarse sustituciones similares con otros aminoácidos, dependiendo de la propiedad deseada de los restos cribados.

Un método más sistemático de identificación de restos de aminoácidos a modificar comprende identificar restos de la región hipervariable implicados en la unión a CXCR5 y aquellos restos de la región hipervariable con poca o ninguna participación con la unión a CXCR5. Se realiza un barrido de alanina de los restos no de unión de la región hipervariable, con cada mutante de ala probado para potenciar la unión a CXCR5. En otra realización, se selecciona(n) aquel (aquellos) resto(s) significativamente implicado(s) en la unión a CXCR5 para ser modificados. La modificación puede implicar la delección de un resto o inserción de uno o más restos adyacentes a un resto de interés. Sin embargo, normalmente, la modificación implica la sustitución del resto con otro aminoácido. Una sustitución conservativa puede ser una primera sustitución. Si una sustitución tal produce un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), entonces puede hacerse otra sustitución conservativa para determinar si se obtienen cambios más sustanciales.

La modificación aún más sustancial en una gama de anticuerpos y la presentación de propiedades biológicas pueden llevarse a cabo seleccionando un aminoácido que se diferencia más sustancialmente en las propiedades del que normalmente reside en un sitio. Así, puede hacerse una sustitución tal mientras que se mantiene: (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal; (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral.

Por ejemplo, los aminoácidos que existen de forma natural pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: metionina (M o met), alanina (A o ala), valina (V o val), leucina (L o leu) e isoleucina (I o ile);
- (2) neutros, hidrófilos: cisteína (C o cys), serina (S o ser), treonina (T o thr), asparagina (N o asn) y glutamina (Q o gln);
- (3) ácidos: ácido aspártico (D o asp) y ácido glutámico (E o glu);
- 5 (4) básicos: histidina (H o his), lisina (K o lys) y arginina (R o arg);
- (5) restos que influyen en la orientación de cadenas: glicina (G o gly) y prolina (P o pro), y
- (6) aromáticos: triptófano (W o trp), tirosina (Y o tyr) y fenilalanina (F o phe).

Sustituciones no conservativas pueden conllevar el intercambio de un aminoácido con un aminoácido de otro grupo. Sustituciones conservativas pueden conllevar el intercambio de un aminoácido con otro dentro de un grupo.

- 10 Sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia de péptidos que existen de forma natural. Por ejemplo, puede hacerse
- 15 sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que existe de forma natural (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del (de los) dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o romper otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental), a no ser por un cambio en la masa o conformación del grupo R o
- 20 cadena lateral. Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354:105(1991).

- Generalmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos de cualquiera del dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-CXCR5 humano parental, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y frecuentemente al menos el 95 % de identidad. La identidad o similitud con respecto a la secuencia de anticuerpos parental se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades comunes de las cadenas laterales, arriba) con los restos de anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia.
- 25
- 30

- Alternativamente, pueden generarse mutantes de anticuerpo por mutación sistemática de las regiones FR y CDR de las cadenas pesadas y ligeras, o la región F<sub>c</sub> del anticuerpo anti-CXCR5. Otro procedimiento para generar mutantes de anticuerpo implica el uso de maduración por afinidad usando presentación en fagos (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Se sabe que las fusiones de la proteína de la cubierta del bacteriófago (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); y la patente de EE.UU. N.º 5.223409) son útiles para enlazar el fenotipo de las proteínas o péptidos presentados a las partículas de bacteriófago que las codifican. Los dominios F<sub>ab</sub> de anticuerpos también han sido presentados en fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991), y Garrard et al. Biotechnol 9:1373 (1991)).
- 35
- 40

- La presentación en fagos consiste en presentar un conjunto de variantes de proteína como fusiones de una proteína de la cubierta del bacteriófago sobre partículas de fago (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). La maduración por afinidad, o mejora de las afinidades de unión en equilibrio de diversas proteínas, se ha logrado previamente mediante aplicación sucesiva de mutagénesis, presentación en fagos monovalentes y análisis funcional (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); y la patente de EE.UU. N.º 5.534.617), por ejemplo, centrándose en las regiones CDR de anticuerpos (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); y Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).
- 45

- Pueden construirse bibliotecas de muchas (por ejemplo, 10<sup>6</sup> o más) variantes de proteína, que se diferencia en posiciones definidas en la secuencia, en partículas de bacteriófago, cada una de las cuales contiene ADN que codifica la variante de proteína particular. Después de ciclos de purificación por afinidad, usando un antígeno inmovilizado, se aíslan clones de bacteriófago individuales, y la secuencia de aminoácidos de la proteína presentada se deduce del ADN.
- 50

- Tras la producción del mutante de anticuerpo, la actividad biológica de esa molécula con respecto al anticuerpo parental puede determinarse como se enseña en el presente documento. Como se observa anteriormente, eso puede implicar determinar la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas o propiedades físicas del anticuerpo.
- 55

En una realización preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se criba para afinidad de unión por el antígeno. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados del cribado se someten opcionalmente a uno o más ensayos de actividad biológica adicional para confirmar que el (los) mutante(s) de anticuerpo tienen propiedades nuevas o mejoradas. En realizaciones preferidas, el mutante de anticuerpo retiene la capacidad de unirse a CXCR5 con una afinidad de unión similar a o mejor/más alta que la del anticuerpo parental.

El (Los) mutante(s) de anticuerpo así seleccionados pueden someterse a modificaciones adicionales, frecuentemente dependiendo del uso previsto del anticuerpo. Tales modificaciones pueden implicar alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Por ejemplo, un resto de cisteína no implicado en mantener la apropiada conformación del mutante de anticuerpo puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y para prevenir la reticulación anómala. En cambio, puede añadirse una cisteína al anticuerpo para mejorar la estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento F<sub>v</sub>).

Otro tipo de mutante de anticuerpo tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto puede ser logrado delecionando uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos normalmente está o bien unida en N a Asn o unida en O a Ser o Thr. Las secuencias de tripéptidos, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento comunes, para la unión enzimática de un resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. La N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o xilosa, por ejemplos, están unidas a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original puede potenciar la probabilidad de glucosilación unida en O.

Puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para potenciar la eficacia del anticuerpo. Para

Modificaciones covalentes del anticuerpo están incluidas dentro del alcance de la invención. Tales pueden hacerse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar los restos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con el resto del extremo N o extremo C.

Pueden hacerse reaccionar restos de cisteinilo con  $\alpha$ -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también pueden ser derivatizados mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidazolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridildisulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuro-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, por ejemplo.

Pueden derivatizarse restos de histidilo mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0. También puede usarse bromuro de p-bromofenacilo, la reacción se realiza preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Pueden hacerse reaccionar restos de lisinilo y  $\alpha$ -terminales con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico para invertir la carga de los restos. Otros reactivos adecuados para derivatizar los restos que contienen  $\alpha$ -amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenenosulfónico, O-metilisourea y 2,4-pentanodiona, y el aminoácido puede ser catalizado por transaminasa con glioxilato.

Pueden modificarse restos de arginino mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina frecuentemente requiere condiciones de reacción alcalinas. Además, los reactivos pueden reaccionar con lisina, además del grupo  $\epsilon$ -amino de la arginina.

La modificación específica de restos de tirosilo puede hacerse con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Por ejemplo, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo pueden ser yodados usando <sup>125</sup>I o <sup>131</sup>I para preparar proteínas marcadas para su uso en un radioinmunoensayo.

Pueden modificarse grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) mediante reacción con carbodiimidas (R-N=C=C-R'), donde R y R' puede ser grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, pueden convertirse restos aspartilo y glutamilo en restos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Los restos glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de aquellos restos entra dentro del alcance de la presente invención.

Otra modificación incluye hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serinilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

- 5 Otra tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente los glucósidos al anticuerpo. Aquellos procedimientos no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación unida en N o unida en O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) pueden unirse a: (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como aquellos de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como aquellos de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Tales métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin & Wriston, *CRC Crit Rev Biochem*, pp. 259-306 (1981).

- 15 La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química, por ejemplo, puede requerir la exposición del anticuerpo al compuesto, ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente, produciendo la escisión de la mayoría de o todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe, por ejemplo, en Hakimuddin et al. *Arch Biochem Biophys* 259:52 (1987) y en Edge et al., *Anal Biochem* 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en anticuerpos puede lograrse por cualquiera de una variedad de endoglucosidasas y exoglucosidasas como se describe, por ejemplo, en Thotakura et al., *Meth Enzymol* 138:350(1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxilalquilenos, en la manera expuesta en las patentes de EE.UU. N.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

- 25 Otra técnica preferida para obtener mutantes o muteínas es la maduración por afinidad por presentación en fagos (Hawkins et al., *J Mol Biol* 254:889-896 (1992); y Lowman et al., *Biochemistry* 30(45):10832-10838 (1991)). Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpo así generados se presentan en modo monovalente sobre partículas de fago como fusiones con una proteína encontrada en las partículas. El fago que expresa los diversos mutantes puede someterse a ciclos a través de rondas de unión

- 30 El método de selección de novedosos polipéptidos de unión puede utilizar una biblioteca de polipéptidos estructuralmente relacionados. La biblioteca de polipéptidos estructuralmente relacionados, por ejemplo, fusionada con una proteína de la cubierta del fago, se produce por mutagénesis, y se presenta sobre la superficie de la partícula. Las partículas se ponen entonces en contacto con una molécula diana y aquellas partículas que tienen la afinidad más alta por la diana se separan de aquellas de afinidad más baja. Los agentes de unión de alta afinidad se amplifican entonces por infección de un hospedador bacteriano adecuado y se repite la etapa de unión competitiva. El proceso se repite hasta que se obtienen polipéptidos de la afinidad deseada.

- 40 Alternativamente, también puede usarse fago multivalente (McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; y Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628) para expresar mutaciones puntuales al azar (por ejemplo, generadas por el uso de una ADN polimerasa propensa a error) para generar una biblioteca de fragmentos de anticuerpos en fagos que entonces podría cribarse para afinidad por CXCR5, Hawkins et al., (1992) *J Mol Biol* 254:889-896.

- 45 Preferentemente, durante el proceso de maduración por afinidad, el vector de expresión replicable está bajo el estricto control de un elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de manera que la cantidad o número de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión sea inferior a aproximadamente el 1 %. También preferentemente, la cantidad de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión es inferior al 10 % de la cantidad de partículas que presentan una única copia de la proteína de fusión. Preferentemente, la cantidad es inferior al 20 %.

- 50 Pueden producirse equivalentes funcionales intercambiando diferentes CDR de diferentes cadenas de anticuerpo dentro de una región estructural o una FR compuesta derivada de anticuerpos plurales. Así, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para un conjunto dado de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, por ejemplo, IgG<sub>1-4</sub>, IgM, IgA<sub>1-2</sub> o IgD, dando tipos e isotipos de anticuerpos contra CXCR5 diferentes. Similarmente, pueden producirse anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención incorporando un conjunto dado de CDR dentro de una región estructural completamente sintética.

Por ejemplo, una región estructural adecuada y porción F<sub>c</sub> para llevar la región variable o una o más CDR de interés se obtiene de una molécula IgG4, que tiene función efectora reducida.

- 55 En otras realizaciones, para potenciar las propiedades de una molécula de unión a CXCR5 de interés, pueden hacerse ciertas modificaciones a la porción de la región estructural y/o porción F<sub>c</sub> de la molécula que lleva la porción de unión al antígeno de una molécula de interés. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos para potenciar o para reducir las propiedades de interés. Así, en una molécula IgG4, son adecuadas sustituciones en

sitios conocidos por afectar la función, por ejemplo, en la región bisagra, en una región que afecta una función efectora o que afecta la unión de  $F_c$ , por ejemplo, para la modificación. En una molécula IgG4, puede hacerse sustituciones, usando la numeración de Kabat, en el aminoácido 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, etc., o combinaciones de los mismos, para obtener propiedades deseadas. Por ejemplo, el sustituir la serina 241 por una prolina puede estabilizar las estructuras terciarias y cuaternarias de la molécula (Mol Imm 30(1)105-108, 1993), y el sustituir la leucina 248 por ácido glutámico puede disminuir la(s) función (funciones) efectora(s) (J Imm 164(4)1925-1033, 2000; y Clin Imm 98(2)164-174, 2001).

Otra propiedad beneficiosa es obtener un derivado de anticuerpo que se une a CXCR5 pero, por ejemplo, no agota los linfocitos B. Esto puede ser ventajoso ya que la producción de anticuerpos en un paciente no está comprometida. El tratamiento con un reactivo tal también facilita una pauta de combinación con un segundo fármaco para una indicación particular que actúa a un nivel distinto de en el linfocito B. Esto puede ser al nivel del linfocito T, por ejemplo.

Por tanto, por ejemplo, se trató 16D7-HC1-LC3 para contener dos sustituciones, S241P y L248E. Los restos de prolina y ácido glutámico confieren propiedades deseadas en una molécula de unión a CXCR5 de interés que lleva una región estructural de IgG4, tal como estabilidad y función efectora reducida.

Los fragmentos de anticuerpos y equivalentes funcionales de la presente invención engloban aquellas moléculas con un grado detectable de unión específica a CXCR5. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos el 10-100 %, preferentemente al menos el 50 %, 60 % o 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 99 % de la capacidad de unión de un anticuerpo de interés. También están incluidos equivalentes con una afinidad superior al 100 % de la de un anticuerpo de interés.

Las CDR generalmente son de importancia para el reconocimiento de epítopes y la unión de anticuerpo. Sin embargo, pueden hacerse cambios a restos que comprenden las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo para reconocer y para unirse al epítipo relacionado. Por ejemplo, puede hacerse cambios que no afectan el reconocimiento de epítopes, aunque aumenten la afinidad de unión del anticuerpo por el epítipo. Varios estudios han medido los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diversas posiciones en la secuencia de un anticuerpo, basándose en el conocimiento de la secuencia de anticuerpo primario, en las propiedades del mismo, tal como unión y nivel de expresión (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; y Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

Así, pueden generarse equivalentes de un anticuerpo de interés cambiando las secuencias de los genes de la cadena pesada y ligera en CDR1, CDR2 o CDR3, o regiones estructurales, usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos, mutagénesis en casete, PCR propensa a error, barajado de ADN o cepas mutantes de *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; y Adey et al., 1996, Cap. 16, pp. 277-291, en Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Los métodos de cambio de la secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo primario pueden producir anticuerpos con afinidad mejorada (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; y Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

Pueden usarse ciclos repetidos de "selección de polipéptidos" para seleccionar unión de afinidad cada vez más alta por, por ejemplo, la selección de cambios de aminoácidos múltiples que son seleccionados por selección múltiple de ciclos. Tras una primera ronda de selección, que implica una primera región de selección de aminoácidos en el ligando o polipéptido de anticuerpo, se realizan rondas de selección adicionales en otras regiones o aminoácidos del ligando. Los ciclos de selección se repiten hasta que se logran las propiedades de afinidad deseadas.

Anticuerpos mejorados también incluyen aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan por las técnicas convencionales de inmunización de animales, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

"Antagonista" se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas de una molécula diana, tales como señalización por CXCR5. Los antagonistas pueden interferir con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, incapacitando o destruyendo células activadas por un ligando, y/o interfiriendo con la activación del receptor o ligando (por ejemplo, activación de tirosina cinasa) o transducción de señales después de la unión del ligando a un receptor. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones receptor-ligando o puede reducir sustancialmente tales interacciones. Todos aquellos puntos de intervención por un antagonista deben considerarse equivalentes para los fines de la presente invención. Así, dentro del alcance de la invención están incluidos antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a CXCR5, CXCL13 u otros ligandos de CXCR5, o un complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13; variantes de la secuencia de aminoácidos o derivados de CXCR5 o CXCL13 que antagonizan la interacción entre CXCR5 y un ligando, tal como CXCL13; CXCR5 soluble, opcionalmente fusionado con una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoadhesina); un complejo que comprende CXCR5 en asociación con otro receptor o molécula biológica; péptidos de secuencia sintética o nativa que se unen a CXCR5; etc.

"Agonista" se refiere a un compuesto, que incluye una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, una molécula grande, una molécula pequeña, que activa una o más actividades biológicas de CXCR5. Los agonistas pueden interactuar con la unión de un receptor a un ligando y vice

5 Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" incluyen la progenie de los mismos. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica, tal como en contenido de ADN, debido a mutación deliberada o accidental. Está incluida progenie de variante que tiene la misma función o propiedad biológica de interés, como se criba en la célula original. Las "células hospedadoras" usadas en la presente invención generalmente son hospedadores procariontes o eucariotes, seleccionados como una elección de diseño.

10 "Transformación" de un organismo celular, célula o línea celular con un ácido nucleico significa introducir un ácido nucleico en la célula diana de manera que el ácido nucleico sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica, y, opcionalmente, se exprese. "Transfección" de una célula o organismo con un ácido nucleico se refiere a la captación del ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo, tanto si en realidad se expresa como si no cualquier secuencia codificante. Los términos  
15 "célula hospedadora transfectada" y "transformada" se refieren a una célula en la que se introdujo un ácido nucleico. Células hospedadoras procariontes típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Células hospedadora eucariotes típicas son células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, o de origen humano. La secuencia de ácidos nucleicos introducida puede ser de la misma especie que la célula hospedadora o de una especie diferente de la célula hospedadora, o puede ser una secuencia de ácidos nucleicos híbrida, que contiene algunos ácidos  
20 nucleicos extraños y algunos homólogos.

El término "vector" significa una construcción de ácidos nucleicos, un vehículo, que contiene un ácido nucleico, el transgén, el gen extraño o el gen de interés, que puede estar operativamente unido a secuencias de control adecuadas para la expresión del transgén en un hospedador adecuado. Tales secuencias de control incluyen, por  
25 ejemplo, un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o precisamente una posible inserción genómica. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede duplicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedador, o puede en algunos casos integrarse en el genoma de la célula hospedadora. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan  
30 indistintamente, ya que plásmido es una forma comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores que sirven a una función de vehículo equivalente y que son conocidas, o llegan a serlo, en la técnica, tales como virus, moléculas sintéticas que llevan ácidos nucleicos, liposomas y similares.

"Mamífero", para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye animales humanos, domésticos y de granja, primates no humanos, y animales de zoológico, para deportes o  
35 mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

Los anticuerpos de interés pueden cribarse o pueden usarse en un ensayo como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica. Frecuentemente, tales ensayos requieren que un reactivo sea detectable, es decir, por ejemplo, esté marcado. La palabra "marca", cuando se usa en el presente documento, se  
40 refiere a un compuesto o composición detectable que puede conjugarse directa o indirectamente con una molécula o proteína, por ejemplo, un anticuerpo. La marca puede ella misma ser detectable (por ejemplo, marcas de radioisótopo, partículas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Como se usa en el presente documento, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la que puede adherirse una entidad o molécula, tal como el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas englobadas en el  
45 presente documento incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, pueden usarse en una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Así, la fase sólida puede ser un papel, una perla, un plástico, un chip, etc., puede estar hecha de una variedad de  
50 materiales, tales como nitrocelulosa, agarosa, poliestireno, polipropileno, silicio, etc., y puede estar en una variedad de configuraciones.

Pueden usarse CXCR5 soluble o fragmentos del mismo, tales como el dominio extracelular (EC), como inmunógenos para generar anticuerpos de interés. El inmunógeno puede obtenerse o aislarse de fuentes naturales o puede prepararse recombinantemente. Pueden usarse células completas, tales como células CXCR5<sup>+</sup>, células  
55 derivadas de una fuente natural (por ejemplo, linfocito B, líneas de linfocitos B o líneas de células cancerosas) o células transformadas (o transfectadas) por técnicas recombinantes para expresar, y quizás para expresar en exceso CXCR5, como el inmunógeno para preparar los anticuerpos de interés. Por tanto, pueden usarse preparaciones de membrana que llevan CXCR5 o péptidos sintéticos o polipéptidos truncados correspondientes a las regiones EC de CXCR5, como se conoce en la técnica.

El EC, que tiene aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, o porciones del mismo, de CXCR5 puede usarse como el inmunogén. Otras formas del inmunogén útiles para preparar anticuerpos, tales como un conjugado, serán evidentes para aquellos en la materia. Así, puede unirse CXCR5, o porciones del mismo, a una molécula transportadora, tal como albúmina o KLH, que van a usarse como inmunogén. Por supuesto, con células que expresan CXCR5, es el dominio EC que es el inmunogén preferido o porción del inmunogén.

El gen o un ADNc que codifica CXCR5, como se conoce en la técnica, puede clonarse en un plásmido u otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de varios sistemas de expresión según métodos muy conocidos para aquellos expertos en la materia, y véase más adelante, por ejemplo. Debido a la degeneración del código genético, pueden usarse una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican proteína CXCR5 o polipéptidos en la práctica de expresar CXCR5 recombinante o productos funcionales del mismo. La secuencia de nucleótidos puede variar seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones, tales como aquellos preferidos por la célula hospedadora. Las combinaciones se hacen según el código genético triplete estándar como se aplica a la secuencia de nucleótidos que codifica CXCR5 que existe de forma natural y pueden considerarse todas aquellas variaciones. Así, la secuencia codificante de CXCR5 puede ser recodificada para contener codones que expresan el aminoácido de interés, sin embargo, el codón triplete es uno favorecido por la maquinaria de expresión génica de la célula hospedadora, tal como una célula humana. Puede usarse uno cualquiera de aquellos polipéptidos en la inmunización de un animal, tal como un camélido, u otro sistema para generar anticuerpos que se unen a CXCR5.

Como se ha mencionado anteriormente, el inmunogén CXCR5 puede expresarse, cuando sea beneficioso, como una proteína de fusión que tiene CXCR5 unido a un segmento de fusión, que generalmente es un polipéptido con una o más funciones beneficiosas. El segmento de fusión frecuentemente ayuda en la purificación de proteínas, por ejemplo, permitiendo que la proteína de fusión sea aislada y purifique por cromatografía de afinidad, pero también puede usarse para aumentar inmunogenicidad. Pueden producirse proteínas de fusión cultivando una célula recombinante transformada con una secuencia de ácidos nucleicos de fusión que codifica una proteína unida a cualquiera del extremo carboxilo y/o amino del polipéptido CXCR5. Los segmentos de fusión pueden incluir, pero no se limitan a, regiones F<sub>c</sub> de inmunoglobulina, glutatión-S-transferasa, β-galactosidasa, un segmento de poli-histidina capaz de unirse a un ión de metal divalente y proteína de unión a maltosa.

Pueden prepararse moléculas de ácidos nucleicos que codifican mutantes de secuencias de aminoácidos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Los métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión mutante o no mutante anteriormente preparada de la molécula de interés (véase, por ejemplo, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488(1985)).

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención, un anticuerpo monocatenario de la invención o una muteína de anticuerpo de la invención) incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo como se describe en el presente documento. Una vez ha sido obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante como se conoce en la técnica. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Los métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo o fragmento de la invención. En un aspecto de la invención, vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras pueden ser coexpresados en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalló en el presente documento.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de hospedador/vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Tales sistemas de expresión representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Se usan comúnmente células bacterianas, tales como *E. coli*, y células eucariotas para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, células de mamífero, tales como células CHO, conjuntamente con un vector, tales como un que lleva el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); y Cockett et al, Bio/Technology 8:2 (1990)). También pueden usarse plantas y cultivo de células de planta, células de insecto, etc., para preparar las proteínas de interés, como se conoce en la técnica.

Además, se elige una célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento

postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o sistemas de hospedador para garantizar la correcta modificación y procesamiento del anticuerpo expresado de interés. Por tanto, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, COS, 293, 3T3 o de mieloma.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, puede dejarse que células manipuladas crezcan durante uno a dos días en un medio enriquecido, y luego se mueven a medios selectivos. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en un cromosoma y se expandan en una línea celular. Tales líneas celulares manipuladas no solo son útiles para la producción de anticuerpos, sino que son útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interaccionan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), selección de glutamato sintasa en presencia de metionina sulfoximida (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 y véase la página web o bibliografía de Lonza Group Ltd.) y los genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia antimetabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que

Pueden aumentarse los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo por amplificación de vector (por ejemplo, véase Bebbington et al., en DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada al gen de anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos o más vectores de expresión de la invención, por ejemplo, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten expresión igual de polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, tanto los polipéptidos de la cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); y Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por un animal, sintetizado químicamente o expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por CXCR5 después de cromatografía en proteína A y de exclusión por tamaño, etc.), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica, para facilitar la purificación.

Se usó proteína CXCR5 recombinante, como se ejemplifica en los ejemplos más adelante, para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención. De entre los monoclonales obtenidos se seleccionaron aquellos con potencial terapéutico beneficioso, por ejemplo, prevención de la unión del ligando de CXCR5 al mismo. Entonces se modificaron los anticuerpos seleccionados para obtener propiedades beneficiosas, tales como tener estabilidad potenciada *in vivo*.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales, aunque debido a la modificación de anticuerpos para optimizar el uso en el ser humano, además de para optimizar el uso del anticuerpo por sí mismo, se prefieren anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producción y manipulación de proteínas particulares. Métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto (Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988)).

Por ejemplo, un inmunogén, como se ejemplifica en el presente documento, puede administrarse a diversos animales hospedadores que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, camélidos, ratas etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para CXCR5. La administración del inmunogén puede conllevar una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de hospedador, e



5 incluyen, pero no se limitan a, Freund (completo e incompleto), aceite mineral, geles, alumbre (hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsión de aceite, hemocianinas de lapa californiana (KLH), dinitrofenol y adyuvantes humanos posiblemente útiles, tales como BCG (*bacillus de Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden  
 5 emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). Los protocolos de inmunización son muy conocidos en la técnica y pueden realizarse por cualquier método que provoque una respuesta inmunitaria en el animal hospedador elegido. Así, pueden usarse diversas vías de administración durante diversos periodos de tiempo como una elección de diseño.

10 Normalmente, el inmunogén (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o por vía intravenosa. El inmunogén puede incluir un polipéptido CXCR5, una proteína de fusión, o variantes de los mismos, que pueden producirse por una célula que produce o produce en exceso CXCR5, que puede ser una célula que existe de forma natural, una célula mutante que existe de forma natural o una célula genéticamente manipulada. En ciertas circunstancias, pueden usarse células completas que expresan CXCR5. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, porcentaje de hidrofobia, porcentaje  
 15 de hidrofilia, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), CXCR5 o porción del mismo puede modificarse o conjugarse para ser inmunogénico o más inmunogénico en el animal, tal como un mamífero, que se inmuniza. Por ejemplo, puede conjugarse CXCR5 o una porción del mismo con un vehículo. La conjugación incluye ya sea conjugación química por derivatización de grupos funcionales químicos activos con tanto el inmunogén como la proteína inmunogénica que va a conjugarse tal que se forme un enlace covalente, o mediante metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos para el experto. Ejemplos de tales vehículos o proteínas  
 20 inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, KLH, albúmina de huevo, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos cooperadores T promiscuos. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente.

25 Una vez se obtiene una preparación adecuada, es posible aislar anticuerpos particulares de los anticuerpos plurales por técnicas de separación conocidas, tales como cromatografía de afinidad, inmunopurificación, absorción, etc. De esa forma, puede obtenerse una especie de anticuerpo individual para estudio adicional, por ejemplo, secuenciación para obtener las secuencias de aminoácidos de una o más CDR.

30 Los anticuerpos de la presente invención comprenden preferentemente anticuerpos monoclonales. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridomas, tal como se describe por Kohler et al., Nature 256:495 (1975); la patente de EE.UU. N.º 4.376.110; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) y Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, por ejemplo, preparación y uso de transfectomas, u otros métodos conocidos para el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kosbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); y Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)), y la técnica de hibridomas de VEB (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

40 En el modelo de hibridoma, un hospedador tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón transgénico con genes del sistema inmunitario humano, hámster, conejo, rata, camello u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a CXCR5. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)).

45 Generalmente, en la preparación de hibridomas productores de anticuerpos, se usan o bien linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o bien se usan células del bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Normalmente, se emplea una línea de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas sin fusionar. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

55 Líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas líneas de células de mieloma están las líneas de mieloma murino, tales como aquellas derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, Calif. y células SP2/0, FO o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J Immunol* 133:3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc, pp. 51-63 (1987)). También puede usarse la línea de células de mieloma de ratón NSO (Colección Europea de Cultivos celulares, Salisbury, Wilshire, RU).

Otra alternativa es usar fusión eléctrica en vez de fusión química para formar hibridomas. En lugar de fusión, puede immortalizarse un linfocito B usando, por ejemplo, virus de Epstein Barr u otro gen transformante, véase, por ejemplo, Zurawaki et al., en *Monoclonal Antibodies*, ed., Kennett et al., Plenum Press, pp. 19-33. (1980). También pueden usarse ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas y ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) trasplantados con linfocitos B humanos.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR5. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma puede ser determinada por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA), análisis fluorocitométrico (FACS) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Tales técnicas se conocen en la técnica y están dentro de la experiencia del experto. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal a CXCR5 puede ser determinada, por ejemplo, por un análisis de Scatchard (Munson et al., *Anal Biochem* 107:220 (1980)).

Después de identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan o aíslan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tal como, por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sepharose, proteína G-Sepharose, hidroxilapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Existen en la materia una variedad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, así, la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon eucariota, de fago o procariota.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos, o tales cadenas de fuentes humanas, humanizadas o de otras fuentes) (Innis et al. en *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic (1990), y Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci* 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma sirven de fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células NSO, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Un polipéptido no de inmunoglobulina puede estar sustituido con los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede estar sustituido con los dominios variables de un sitio de combinación de CXCR5 de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Métodos de preparación de anticuerpos monovalentes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de la inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región  $F_c$  para prevenir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes están sustituidos con otro resto de aminoácido o están delecionados para prevenir la reticulación.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopes específicos por técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *J Biochem Biophys Methods* 24:107 (1992); y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Por ejemplo, pueden producirse fragmentos  $F_{ab}$  y  $F_{(ab)2}$  de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos  $F_{ab}$ ) o pepsina (para producir fragmentos  $F_{(ab)2}$ ). Los fragmentos  $F_{(ab)2}$  contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio  $C_{H1}$  de la región constante de la cadena pesada. Sin embargo, aquellos fragmentos pueden ser producidos

directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de una biblioteca de fagos de anticuerpo. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos  $F_{(ab')_2}$ -SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos  $F_{(ab')_2}$  (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992)). Según otro enfoque, pueden aislarse fragmentos  $F_{(ab')_2}$  directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico habitual. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento  $F_v$  de cadena individual ( $F_v$ ) (documento WO 93/16185).

Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos quiméricos, véanse, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); y las patentes de EE.UU. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Anticuerpos humanizados derivan de moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se une a CXCR5 en la que una o más CDR de la misma se insertan en las regiones FR de una molécula de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documentos EPO 239.400; WO 91/09967; y patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento superficial (documentos EPO 592.106; EPO 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); y Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)) y barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos de una fuente que es no humana. Los restos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente restos de "importación", que normalmente son tomados de un dominio variable de "importación". La humanización puede ser esencialmente realizada siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); y Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), sustituyendo CDR no humanas o porciones de secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La región constante de la cadena pesada, que puede incluir uno o más dominios de la cadena pesada, y región bisagra, pueden ser de cualquier clase o subclase para obtener un efecto deseado, tal como una función efectora particular.

Frecuentemente, los restos de la región estructural en las regiones estructurales humanas pueden estar sustituidos con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, y posiblemente mejorar, la unión al antígeno. Las sustituciones de la región estructural se identifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y de la región estructural para identificar restos de la región estructural importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos de la región estructural poco usuales en las posiciones particulares, véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.585.089; y Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

Es preferible además que los anticuerpos humanizados retengan la alta afinidad por CXCR5, y retengan o adquieran otras propiedades biológicas favorables. Así, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Comúnmente están disponibles modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de la muestra permite el análisis de la probable función de ciertos restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a CXCR5. De esa forma, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de las secuencias de receptor y de importación de manera que la característica del anticuerpo deseado, tal como la elevada afinidad por el antígeno diana, se maximice, aunque son los restos de CDR los que influyen directamente y más sustancialmente en la unión a CXCR5. Las regiones CDR también pueden modificarse para contener uno o más aminoácidos que varían de los obtenidos del anticuerpo parental del que se obtuvo la CDR, para proporcionar propiedades potenciadas o diferentes de interés, tales como unión de mayor afinidad o mayor avidez, por ejemplo.

Pueden manipularse y cambiarse ciertas porciones de las regiones constantes de anticuerpo para proporcionar homólogos de anticuerpo, derivados, fragmentos y similares con propiedades diferentes de o mejores que las observadas en el anticuerpo parental. Así, por ejemplo, muchos anticuerpos IgG4 forman enlaces disulfuro intracatenarios cerca de la región bisagra. El enlace intracatenario puede desestabilizar la molécula bivalente parental que forma las moléculas monovalentes que comprenden una cadena pesada con la cadena ligera asociada. Tales moléculas pueden reasociarse, pero en una base al azar.

Se observó que modificar los aminoácidos en la región bisagra de moléculas IgG4 puede reducir la probabilidad de formación de enlaces intracatenarios, estabilizando así la molécula de IgG4, que minimizará la probabilidad de formar moléculas biespecíficas. Esa modificación puede ser beneficiosa si un anticuerpo terapéutico es una molécula de IgG4 ya que la estabilidad potenciada minimizará la probabilidad de que la molécula se disocie durante la producción y fabricación, además de *in vivo*. Un anticuerpo monovalente puede no tener la misma eficacia que la molécula parental bivalente. Por ejemplo, cuando se administra IgG4 bivalente a un paciente, el porcentaje de IgG4 bivalente se deteriora a aproximadamente el 30 % durante un periodo de dos semanas. Una sustitución de aminoácidos en la posición 228 potencia la estabilidad de IgG4. La serina que reside en 228 puede sustituirse con otro aminoácido, tal como uno de los restantes 19 aminoácidos. Un cambio tal puede hacerse particularmente con anticuerpos recombinantes en los que la secuencia codificante de ácidos nucleicos puede mutarse para dar un aminoácido de sustitución en la posición 228. Por ejemplo, S pueden sustituirse con una prolina.

Otro conjunto de aminoácidos adecuados para la modificación incluyen aminoácidos en el área de la bisagra que afectan la unión de una molécula que contiene una cadena pesada con la unión al receptor de F<sub>c</sub> e internalización de anticuerpo unido. Tales aminoácidos incluyen, en moléculas IgG1, los restos de aproximadamente 233 a aproximadamente 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEQ ID NO: 49) de aproximadamente 252 a aproximadamente 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEQ ID NO: 50) y de aproximadamente 318 (Glu) a aproximadamente 331 (Pro), que incluyen, por ejemplo, Lys<sub>320</sub>, Lys<sub>322</sub> y Pro<sub>329</sub>.

Son particularmente deseables anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana, véanse las patentes de EE.UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole et al. y Boerder et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss (1985); y Boerner et al., *J Immunol* 147:86 (1991)).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que también expresan ciertos genes de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden introducirse complejos de genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera humana al azar o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse la región variable humana, región constante y región de diversidad en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de la cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera de ratón pueden convertirse en no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de los loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH previene la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos son entonces criados para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos, véase, por ejemplo, Jakobovitis et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol* 7:33 (1993); y Duchosal et al., *Nature* 355:258 (1992).

Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un CXCR5, por ejemplo, todo o una porción de CXCR5, tal como el dominio EC del mismo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR5 pueden obtenerse de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Así, usando una técnica tal, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general, véase Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13:65-93 (1995). Para una discusión de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos de producción de tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; y WO 96/33735; EPO N.º 0 598 877; y las patentes de EE.UU. N.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, pueden contratarse empresas tales como Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra CXCR5 usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Por tanto, podrían prepararse mAb humanos inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica humana, esplenocitos o médula ósea (por ejemplo, técnica de triomas de XTL Biopharmaceuticals, Israel). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En ese enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespersen et al., *Bio/Technology* 12:899 (1988)).

Si se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o ser directamente secretada en el medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, el residuo de partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, puede eliminarse, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163 (1992) describen un

procedimiento de aislamiento de anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se expone pasta de células a acetato sódico (pH 3,5) y EDTA. Los residuos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Donde la variante de anticuerpo es secretada en el medio, el sobrenadante de tales sistemas de expresión se concentra primero generalmente usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de la proteasa tal como PMSF para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La idoneidad de proteína A o proteína G como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio  $F_c$  de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Landmark et al., *J Immunol Meth* 62:1 (1983)). (Puede usarse proteína G para isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., *EMBO J* 5:1567 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad está unido es casi siempre agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que pueden lograrse con agarosa. Donde la variante de anticuerpo comprenda un dominio  $C_{H3}$ , la resina ABXTM de Bakerbond (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina-agarosa, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo o variante que va a recuperarse.

Tras cualquier etapa preliminar de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo o variante de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, de sal aproximadamente 0-0,25 M).

Además, los anticuerpos de la invención pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos antiidiotipo que "imitan" CXCR5 usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan et al., *FASEB J* 7:437 (1989); y Nissinoff, *J Immunol* 147:2429 (1991)). Por ejemplo, anticuerpos que se unen a y

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión se dirige hacia CXCR5, la otra puede ser por cualquier otro antígeno, tal como una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, ligando, antígeno específico de tejido, proteína viralmente derivada, proteína de la cubierta viralmente codificada, proteína bacterianamente derivada, proteína de la superficie bacteriana, etc. Así, la otra especificidad podría ser por CXCL13.

Son muy conocidos los métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature* 305:537 (1983)). Debido a la selección al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, los hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza normalmente por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Trauneker et al., *EMBO J* 10:3655 (1991). Otros métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos se proporcionan en, por ejemplo, Kufer et al., *Trends Biotech* 22:238-244, 2004.

Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Puede tener la primera región constante de la cadena pesada ( $C_{H1}$ ) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transforman en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo Suresh et al., *Meth Enzym* 121:210 (1986).

También se contemplan anticuerpos heteroconjugados por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. N.º 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Ejemplos de reactivos adecuados para ese fin

incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato, y los desvelados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

Además, pueden generarse anticuerpos de un solo dominio contra CXCR5. Ejemplos de esa tecnología se han descrito en el documento WO9425591 para anticuerpos derivados de Ig de cadena pesada de Camelidae, además de en el documento USA20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos de un solo dominio completamente humanos de bibliotecas de fagos.

Alternativamente, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. N.º 4.946.778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); y Ward, et al., *Nature* 334:544 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región F<sub>v</sub> mediante un puente de aminoácido, produciendo un polipéptido de una sola cadena. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos F<sub>v</sub> funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242:1038 (1988)).

La presente invención engloba anticuerpos recombinantemente fusionados o químicamente conjugados (incluyendo conjugaciones tanto covalentemente como no covalentemente) con un polipéptido. Los anticuerpos condensados o conjugados de la presente invención pueden usarse para facilitar la purificación, véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., *Immunol Lett* 39:91 (1994); patente de EE.UU. N.º 5.474.981; Gillies et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1428 (1992); y Fell et al., *J Immunol* 146:2446 (1991). La secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina (SEQ ID NO: 51), tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles, Gentz et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:821 (1989). Otras marcas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca "HA", que se corresponde con un epítoto derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984)) y la marca "flag".

También pueden crearse moléculas de unión a una única cadena de péptido en las que las regiones F<sub>v</sub> de la cadena pesada y ligera están conectadas. Se describen anticuerpos monocatenarios ("scF<sub>v</sub>") y el método de su construcción en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.946.778. Alternativamente, F<sub>ab</sub> puede construirse y expresarse por medios similares. Todos los anticuerpos completamente y parcialmente humanos pueden ser menos inmunogénicos que los mAb completamente murinos, y los fragmentos y anticuerpos monocatenarios también pueden ser menos inmunogénicos.

Pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de bibliotecas en fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature* 348:552 (1990). Clarkson et al., *Nature* 352:624 (1991) y Marks et al., *J Mol Biol* 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology* 10:779 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nucl Acids Res* 21:2265 (1993)). Así, las técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se prueban anticuerpos anti-CXCR5 por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), FACS, inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas como se conocen en la técnica. Así, pueden usarse linfocitos B o células que expresan CXCR5 para detectar la unión del anticuerpo al mismo usando una técnica conocida, o CXCR5 recombinantemente expresado o porción del mismo, tal como el dominio EC, puede adherirse a una fase sólida y usarse como elemento de captura en un ensayo, configurado como una elección de diseño.

Para determinar si un homólogo de anticuerpo particular se une a CXCR5 humano, puede usarse cualquier ensayo de unión convencional. Ensayos de unión a CXCR5 útiles incluyen análisis de FACS, ensayos de ELISA, radioinmunoensayos y similares, que detectan la unión de anticuerpo, y funciones resultantes del mismo, a CXCR5 humano. Las formas de longitud completa y solubles de CXCR5 humano enseñadas en el presente documento son útiles en tales ensayos. La unión de un anticuerpo u homólogo a CXCR5, o a fragmentos solubles del mismo, puede detectarse convenientemente mediante el uso de un segundo anticuerpo específico para inmunoglobulinas de la especie de la que deriva el anticuerpo u homólogo.

Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular bloquea o no bloquea significativamente la unión de CXCL13 u otro ligando a CXCR5 humano, puede usarse cualquier ensayo de competición adecuado. Ensayos útiles incluyen, por ejemplo, ensayos de ELISA, ensayos de FACS, radioinmunoensayos y similares que cuantifican la capacidad del anticuerpo u homólogo para competir con CXCL13 u otro ligando para unirse a CXCR5 humano. Preferentemente, se mide la capacidad del ligando para bloquear la unión de CXCR5 humano marcado al anticuerpo inmovilizado u homólogo.

Puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo u homólogo para unirse a CXCR5 humano probando la capacidad del mismo para unirse a células CXCR5<sup>+</sup> humanas. Células CXCR5<sup>+</sup> adecuadas para su uso en determinar si un anticuerpo u homólogo particular se une a CXCR5 humano son células de cultivo de tejido de mamífero

transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y que expresa el CXCR5 sobre la superficie celular o líneas de linfocitos B.

5 La unión del anticuerpo u homólogo a la célula CXCR5<sup>+</sup> puede detectarse por tinción de las células con un segundo anticuerpo fluorescentemente marcado específico para inmunoglobulinas de la misma especie de la que deriva el homólogo de anticuerpo que se prueba. Puede usarse un citómetro activado por fluorescencia ("FACS") para detectar y para cuantificar cualquier unión, véase generalmente, Shapiro, Practical Flow Cytometry, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. (1985).

10 Por tanto, la capacidad de un homólogo de anticuerpo para bloquear la unión de un ligando, tal como CXCL13, a CXCR5 humano puede ser determinada preincubando el exceso de ligando con células CXCR5<sup>+</sup> y cuantificando el grado al que el ligando unido bloquea la unión del anticuerpo u homólogo a las células. La unión del homólogo de anticuerpo a las células CXCR5<sup>+</sup> puede cuantificarse por análisis de FACS, usando un segundo anticuerpo fluorescentemente marcado específico para inmunoglobulinas de la misma especie de la que deriva el homólogo de anticuerpo que se prueba. Alternativamente, puede configurarse un ensayo de competición usando ligando o anticuerpo marcado como se conoce en la técnica.

15 El ligando, tal como CXCL13, usado en los ensayos anteriores puede proporcionarse por células transformadas con el gen para el ligando, o por CXCL13 aislado, obtenido poniendo en práctica los métodos enseñados en el presente documento, o comprado comercialmente.

20 Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular no produce disminución significativa en el número de células CXCR5<sup>+</sup> circulantes *in vivo*, se cuantifica el número de células CXCR5<sup>+</sup> circulantes aisladas de un mamífero en el plazo de 24 horas después de la administración del anticuerpo u homólogo a un mamífero que tiene función inmunitaria normal, y se compara con el número pre-administración o el número en un mamífero de control al que se ha administrado un anticuerpo del mismo isotipo u homólogo de especificidad irrelevante en lugar de un anticuerpo u homólogo de la presente invención. La cuantificación de células CXCR5<sup>+</sup> en animales administrados con un anticuerpo contra CXCR5 o porción funcional o derivado del mismo puede llevarse a cabo, por ejemplo, tiñendo las células obtenidas con anticuerpos fluorescentemente marcados que se unen a los anticuerpos anti-CXCR5, además de anticuerpos marcados específicos para linfocitos T y linfocitos B, seguido de análisis de FACS.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en términos del epítoto(s) o porción (porciones) de CXCR5 que el anticuerpo reconoce o a las que se une específicamente a. El (Los) epítoto(s) o porción (porciones) de polipéptido pueden especificarse como se describe en el presente documento, por ejemplo, por posiciones del extremo N y extremo C, por tamaño en los restos de aminoácidos contiguos, epítotos conformacionales, etc.

30 Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de reactividad cruzada. También están incluidos en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos CXCR5, que tienen al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 % y al menos el 50 % de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con CXCR5.

35 Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de la afinidad de unión a un CXCR5 de interés. Los anticuerpos anti-CXCR5 pueden unirse con una K<sub>D</sub> inferior a aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, inferior a aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, o inferior a aproximadamente 10<sup>-5</sup> M. Pueden ser beneficiosas afinidades de unión más altas en un anticuerpo de interés, tales como aquellas con una constante de disociación en equilibrio o K<sub>D</sub> de aproximadamente 10<sup>-8</sup> a aproximadamente 10<sup>-15</sup> M, de aproximadamente 10<sup>-8</sup> a aproximadamente 10<sup>-12</sup> M, de aproximadamente 10<sup>-9</sup> a aproximadamente 10<sup>-11</sup> M, o de aproximadamente 10<sup>-8</sup> a aproximadamente 10<sup>-10</sup> M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítoto de la invención como se ha determinado por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítoto al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, o al menos el 50 %.

40 La presente invención también incluye conjugados que comprenden un anticuerpo de interés. Los conjugados comprenden dos componentes primarios, un anticuerpo de interés y un segundo componente, que puede ser un agente de unión a célula, un agente citotóxico, etc.

45 Como se usa en el presente documento, el término "agente de unión a célula" se refiere a un agente que reconoce específicamente y se une a una molécula sobre la superficie celular. Así, el agente de unión a célula puede ser un antígeno CD, un antígeno patógeno, tal como un antígeno de virus, un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer, un antígeno específico de célula, un antígeno específico de tejido, una Ig o molécula de tipo Ig, etc.

55 En una realización, el agente de unión a célula reconoce específicamente CXCL13 o el complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13. El conjugado puede estar en contacto con la célula diana durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que una función efectora del conjugado actúe sobre la célula, y/o para permitir al conjugado tiempo suficiente en el que va a ser internalizado por la célula.

Los agentes de unión a célula pueden ser de cualquier tipo como se conoce actualmente, o que llegará a ser conocido, e incluye péptidos, no péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, ligandos, receptores, etc., o combinaciones de los mismos. El agente de unión a célula puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, ya sea de una manera específica o no específica. Generalmente, el agente puede ser un anticuerpo (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula de unión a célula o sustancia.

Otros ejemplos de agentes de unión a célula que pueden usarse incluyen: anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales; y fragmentos de anticuerpos tales como  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  y  $F_v$  (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244(1960)).

El segundo componente también puede ser un agente citotóxico. El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o crecimiento, de células y/o produce la destrucción de células. Así, el agente citotóxico puede ser un taxol, un maitansinoide, tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065, una ricina, mitomicina C, etc. En algunas realizaciones, el agente citotóxico, al igual que cualquier agente de unión de un conjugado de la presente invención, se une covalentemente, directamente o mediante un conector escindible o no escindible, a un anticuerpo de interés.

Ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides inhiben la formación de microtúbulos y son altamente tóxicos para las células de mamífero.

Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tiene un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Tales maitansinoides adecuados se desvelan en las patentes de EE.UU. N.º 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados que tiene un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-descloro (patente de EE.UU. N.º 4.256.746) (preparado, por ejemplo, por reducción de LAH de ansamitocina P2); (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (patentes de EE.UU. N.º 4.361.650 y 4.307.016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación usando *Streptomyces* o descloración usando hidruro de litio y aluminio (LAH)); y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- descloro (patente de EE.UU. N.º 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

Ejemplos de análogos de maitansinol adecuados que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen: (1) C-9-SH (patente de EE.UU. N.º 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con  $H_2S$  o  $P_2S_5$ ); (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/ $CH_2OR$ ) (patente de EE.UU. N.º 4.331.598); (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo ( $CH_2OH$  o  $CH_2OAc$ ) (patente de EE.UU. N.º 4.450.254) (preparado de *Nocardia*); (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. N.º 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); (5) C-15-metoxi (patentes de EE.UU. N.º 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); (6) C-18-N-desmetilo (patentes de EE.UU. N.º 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y (7) 4,5-desoxi (patente de EE.UU. N.º 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio / LAH de maitansinol).

Los conjugados citotóxicos pueden prepararse por métodos *in vitro*. Para unir un agente citotóxico, fármaco o profármaco al anticuerpo, comúnmente, se usa un grupo de enlace. Grupos de enlace adecuados son conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles en ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles en peptidasa y grupos lábiles en esterasa. Por ejemplo, pueden construirse conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre un anticuerpo de interés y el fármaco o profármaco.

Como se trata anteriormente, la presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican un anticuerpo o variante funcional del mismo como se desvela en el presente documento, construcciones de vector que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de unión a CXCR5 de la presente invención, células hospedadoras que comprenden un vector tal, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido.

El vector normalmente contiene componentes conocidos en la técnica y generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores o de selección, secuencias que facilitan y/o potencian la traducción, un elemento potenciador, etc. Así, los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos operativamente unida a tales secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o traducción adecuadas tales como aquellas derivadas de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Ejemplos de secuencias reguladoras adicionales incluyen operadores, sitios de unión al ribosoma de ARNm, y/u otras secuencias apropiadas que controlan transcripción y traducción, tales como iniciación y terminación de las mismas. Las secuencias de nucleótidos están "operativamente unidas" cuando la secuencia reguladora está funcionalmente relacionada la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. Así, una secuencia de nucleótidos promotora está operativamente unida a, por ejemplo, la secuencia de cadena pesada del anticuerpo si la secuencia de nucleótidos del promotor controla la transcripción de esa secuencia de nucleótidos.



Además, pueden incorporarse secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están naturalmente asociados a las secuencias de la cadena pesada y/o ligera de anticuerpo en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (conductor secretor) puede fusionarse en marco con la secuencia de polipéptidos de manera que el anticuerpo sea secretado al espacio periplásmico o en el medio. Un péptido señal que es funcional en las células hospedadoras previstas potencia la secreción extracelular del anticuerpo apropiado o porción del mismo. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo de la célula. Ejemplos de tales señales secretoras son muy conocidas e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

El vector puede ser un plásmido, un vector viral monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario o vector de fago de ADN, un fagémido, un cósmido o cualquier otro vehículo de un transgén de interés. Tales vectores pueden introducirse en células como polinucleótidos por técnicas muy conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores de fago y virales, también pueden introducirse en células como virus encapsidados o encapsulados por técnicas muy conocidas para la infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes en la replicación o defectuosos en la replicación. En el último caso, generalmente se producirá propagación viral solo en las células hospedadoras complementarias y usando vectores plurales que llevan los diversos componentes de virus necesarios para producir una partícula. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir la proteína usando ARN derivados de las presentes construcciones de ADN (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de EE.UU. N.º 5.122.464).

Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse a partir de cualquier célula hospedadora adecuada. Ejemplos de células hospedadoras útiles en la presente invención incluyen células procariontas, de levadura o eucariotas superiores e incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, además de *Bacilli*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen las secuencias codificantes de los anticuerpos de interés; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora*, y hongos filamentosos, tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de planta infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; o virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7,5K del virus de la variolovacuna).

Los vectores de expresión para su uso en células hospedadoras procariontas generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípicos. Un gen marcador de selección fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra un requisito autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariontas incluyen aquellos derivados de plásmidos comercialmente disponibles, tales como las series pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) y pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) de vectores (Studier, *J Mol Biol* 219:37 (1991); y Schoepfer, *Gene* 124:83 (1993)). Secuencias promotoras comúnmente usadas para vectores de expresión en células hospedadoras procariontas recombinantes incluyen T7 (Rosenberg et al., *Gene* 56:125 (1987),  $\beta$ -lactamasa (penicilinas), sistema del promotor de lactosa (Chang et al., *Nature* 275:615 (1978); y Goeddel et al., *Nature* 281:544 (1979)), sistema del promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., *Nucl Acids Res* 8:4057 (1980)) y promotor *tac* (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Los vectores de levadura frecuentemente contendrán una secuencia de origen de replicación, tal como de un plásmido de levadura 2 $\mu$ , una secuencia autónomamente replicante (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., *J Biol Chem* 255:2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Holland et al., *Biochem* 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Otros vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levadura se describen además en Fleer et al., *Gene* 107:285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levadura y protocolos de transformación en levadura son bien conocidos en la materia. Los protocolos de transformación en levadura son muy conocidos. Un protocolo tal se describe por Hinnen et al., *Proc Natl Acad Sci* 75:1929 (1978), que selecciona transformantes Trp<sup>+</sup> en un medio selectivo.

Cualquier cultivo celular eucariota es factible, tanto de cultivo de vertebrado como de invertebrado. Ejemplos de células de invertebrado incluyen células de planta y de insecto (Luckow et al., *Bio/Technology* 6:47 (1988); Miller et

al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); y Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Por ejemplo, pueden usarse sistemas de Baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, puede usarse virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). Otros hospedadores que se han identificado incluyen *Aedes*, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*. Está públicamente disponible una variedad de cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de AcNPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV. Además, también se utilizan cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como hospedadores como se conoce en la técnica.

Las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado, en cultivo (cultivo de tejido) pueden ser un procedimiento rutinario, aunque existen líneas celulares exigentes que requieren, por ejemplo, un medio especializado con factores únicos, células nodrizas, etc., véase Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón de hámster bebé; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón; células de carcinoma de cuello uterino humano (por ejemplo, HeLa); células de riñón canino; células de pulmón humano; células de hígado humano; tumor mamario de ratón; y células NS0.

Las células hospedadoras se transforman con vectores para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutritivo convencional que contiene factores de crecimiento, vitaminas, minerales, etc., además de inductores apropiados para las células y vectores usados. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras comúnmente usadas derivan de virus del polio, adenovirus 2, virus simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de genes estructural en una célula hospedadora de mamífero, por ejemplo, origen SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, sitios de corte y empalme y de poliadenilación. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles debido a que ambos son fácilmente obtenidos de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen viral de replicación. Están comercialmente disponibles vectores de expresión a modo de ejemplo para su uso en células hospedadoras de mamífero.

Medio comercialmente disponible tal como Ham's F10, medio esencial mínimo (MEM), RPMI-1640 y medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) son adecuados para cultivar células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979) y Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), y en las patentes de EE.UU. N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de aquellos medios puede ser complementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factores de crecimiento epidérmicos), sales (tales como cloruros, tales como cloruros de sodio, calcio o magnesio; y fosfatos), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas, como una elección de diseño. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son como se conocen en la técnica apropiados para la célula y para permitir la expresión deseada del transgén.

Pueden obtenerse los polinucleótidos de interés, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)) y entonces amplificar los oligonucleótidos unidos, por ejemplo, por PCR.

Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo a partir de ácido nucleico de una célula que lo expresa. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina de una fuente adecuada, tal como una biblioteca, que puede ser específica para células productoras de anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención. Pueden configurarse cebadores adecuados para amplificación por PCR. Entonces pueden clonarse ácidos nucleicos amplificados generados por PCR en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

Una vez se determinan la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse para obtener los equivalentes de interés descritos en el presente documento usando métodos conocidos en la técnica para manipular secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998) para generar anticuerpos que tienen una

secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

Puede inspeccionarse la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera para identificar las secuencias de las CDR por métodos muy conocidos, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, pueden insertarse una o más de las CDR dentro de regiones estructurales, por ejemplo, en regiones estructurales humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describen arriba. El polinucleótido de interés generado por la combinación de las regiones estructurales y una o más CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a CXCR5, o al menos el dominio ED del mismo. Por ejemplo, tales métodos pueden usarse para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar CXCR5 y, por tanto, células que expresan CXCR5, en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el anticuerpo anti-CXCR5 de la invención se usa para determinar la presencia y el nivel de CXCR5 en un tejido o en células derivadas del tejido. Los niveles de CXCR5 en el tejido o biopsia pueden determinarse, por ejemplo, en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención. El tejido o biopsia del mismo puede congelarse o fijarse. Pueden usarse los mismos métodos u otros métodos para determinar otras propiedades de CXCR5, tales como el nivel del mismo, localización celular, niveles de ARNm, mutaciones del mismo, etc.

El método anteriormente descrito puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe que tiene o que se sospecha que tiene un cáncer, en el que el nivel de CXCR5 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto de referencia normal o patrón. El ensayo de interés también puede usarse para diagnosticar artritis u otras enfermedades autoinmunitarias caracterizadas por infiltración y concentración de linfocitos B, junto con desarrollo de tejido linfoide diferenciado.

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítipo de los mismos que están además marcados para su uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En algunas realizaciones, la marca es una radiomarca, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de obtención de imágenes o un ión metálico.

También se proporciona un método de diagnóstico en el que dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión al epítipo de los mismos se administran a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, artritis, enfermedades autoinmunitarias u otra enfermedad de CXCR5, y se mide o monitoriza la distribución de la marca dentro del cuerpo del sujeto.

El anticuerpo y fragmentos del mismo de la presente invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En ese proceso, los anticuerpos se inmovilizan sobre una fase sólida, tal como una resina de dextrano o agarosa o papel de fibra, usando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene CXCR5 o células que llevan el mismo que van a purificarse, y a partir de aquí el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, excepto CXCR5 o la célula que va a purificarse, que está unida al anticuerpo inmovilizado de interés. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5,0, que liberará CXCR5 o la célula del anticuerpo de interés.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo de interés normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$  (el anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando recuento por centelleo); (b) marcas fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, cualquier Texas Red, las marcas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando una técnica desvelada en Current Protocols in Immunology, arriba, por ejemplo, donde la fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro; y (c) están disponibles diversas marcas de sustrato de enzima (patente de EE.UU. N.º 4.275.149 proporciona una revisión), la enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas, por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente, o la enzima puede alterar la fluorescencia, o quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia, por ejemplo, usando un luminómetro, o la marca dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

Cuando se usan tales marcas, están disponibles sustratos adecuados, tales como: (i) para peroxidasa de rábano picante con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en el que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)); (ii) para fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de p-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y (iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico tal como 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

Están disponibles otras combinaciones enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia. Para una revisión general, véanse las patentes de EE.UU. N.º 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, la marca se conjuga indirectamente con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de los indicadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y así la marca puede conjugarse con el anticuerpo de esa manera indirecta. Alternativamente, para lograr conjugación indirecta de la marca, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas o indicadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-dioxina. Así, puede lograrse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo o mutéina usando un segundo anticuerpo.

En otra realización de la invención, el anticuerpo no necesita marcarse, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo, otra forma de un segundo anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con la muestra de prueba para unión con una cantidad de anticuerpo limitada. La cantidad de antígeno en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que llega a unirse a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que llega a unirse, los anticuerpos generalmente son insolubilizados antes o después de la competición. Como resultado, el patrón y la muestra de prueba que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y la muestra de prueba que siguen sin unir.

Los ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, determinante o epítipo, de la diana que va a detectarse. En un ensayo de sándwich, la muestra de prueba que va a analizarse se une por un primer anticuerpo que se inmoviliza directa o indirectamente sobre un soporte sólido, y a partir de aquí un segundo anticuerpo directa o indirectamente marcado se une a la muestra de prueba unida, formando así un complejo de tres partes insoluble, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede él mismo marcarse con un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina u otro miembro adecuado del par de unión (anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, enzima/sustrato, por ejemplo) que se marca con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la célula o muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede incorporarse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el mutante de anticuerpo se marca con un radionucleótido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ) de manera que los sitios que expresan CXCR5 pueden localizarse usando inmunoescintigrafía.

La presente invención también incluye kits, por ejemplo, que comprenden un anticuerpo, fragmento del mismo, homólogo, derivado del mismo, etc., tal como un conjugado marcado o citotóxico, e instrucciones para el uso del anticuerpo, conjugado para destruir tipos particulares de células, etc. Las instrucciones pueden incluir indicaciones para usar el anticuerpo, conjugado, etc., *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El anticuerpo puede estar en forma líquida o como un sólido, generalmente liofilizado. El kit puede contener otros reactivos adecuados, tales como un tampón, una disolución de reconstitución y otros componentes necesarios para el uso previsto. Se contempla una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para el uso de la misma, tal como para un uso terapéutico para realizar un ensayo de diagnóstico. Donde el anticuerpo se marca, tal como con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse para proporcionar concentrados de una disolución de un reactivo, que proporciona flexibilidad al usuario, economía de espacio, economía de reactivos, etc. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes, que tras la disolución proporcionan una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar un mamífero. En una realización, el anticuerpo o equivalente de interés se administra a un mamífero no humano para los fines de obtener datos preclínicos, por

ejemplo. Mamíferos no humanos a modo de ejemplo que van a tratarse incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad que va a tratarse con el anticuerpo, o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de aquellas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de dosis en el mamífero.

Puede usarse un anticuerpo, con o sin un segundo componente, tal como un resto terapéutico conjugado con el mismo, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s), como terapéutico. La presente invención se refiere a terapias basadas en anticuerpo que implican administrar los anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero, o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediado por CXCR5. El animal o sujeto puede ser un mamífero en necesidad de un tratamiento particular, tal como un mamífero que ha sido diagnosticado con un trastorno particular, por ejemplo, uno relacionado con CXCR5. Los anticuerpos dirigidos contra CXCR5 son útiles, por ejemplo, para la profilaxis o el tratamiento de artritis, enfermedades inflamatorias, en general, rechazo de injerto, cáncer y trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo anti-CXCR5 de la presente invención, o una mezcla de una pluralidad de los presentes anticuerpos o equivalentes de los mismos, o en combinación con otros anticuerpos de fuentes variables, pueden mejorarse o prevenirse los síntomas de enfermedad en el mamífero tratado, particularmente seres humanos.

Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos, equivalentes y derivados de los mismos como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como se describe en el presente documento (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos) y anticuerpos antiidiotípicos como se describe en el presente documento. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados a la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, que incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritos en el presente documento. El tratamiento y/o la prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociados a la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5 incluyen, pero no se limita a, aliviar al menos un síntoma asociado a aquellas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento. El término "fisiológicamente aceptable", "farmacológicamente aceptable", etc., significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

El anticuerpo anti-CXCR5 puede administrarse a un mamífero de cualquier manera aceptable. Métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, inhalación y oral, y si se desea para tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intrarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede desearse introducir los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra mediante inyección, preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

Se conocen diversos otros sistemas de administración y pueden usarse administrar un anticuerpo de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas (véanse Langer, *Science* 249:1527 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infections Disease and Cancer*; Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); y Lopez-Berestein, arriba., p. 317-327) y células recombinantes capaces de expresar el compuesto; endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., *J Biol Chem* 262:4429 (1987)); construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osal, Ed. (1980).

También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. El anticuerpo también puede administrarse en los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.514.496.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; que puede lograrse por, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, administración tópica, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferentemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, se tiene cuidado de usar materiales a los que la proteína no se absorba o adsorba.

En otra realización más, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véanse Langer, *Science* 249:1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); y Saudek et al., *N Engl J Med* 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véanse *Medical Applications of Controlled Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); véanse también Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann Neurol* 25:351 (1989); y Howard et al., *J Neurosurg* 71:105 (1989)). En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede disponerse en proximidad de la diana terapéutica.

Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizadores "farmacéuticamente aceptables" opcionales, normalmente empleados en la materia, es decir, agentes de tamponamiento, agentes estabilizantes, conservantes, isotonzantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>a</sup> ed., Osol, ed. (1980). Tales aditivos son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, por tanto, los excipientes, diluyentes, vehículos, etc., son farmacéuticamente aceptables.

Un anticuerpo "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos o medio del que deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El vocabulario "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el polipéptido/proteína se separa de componentes celulares de las células de las que él mismo se aísla o produce recombinantemente. Así, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % (por peso seco) de proteína contaminante. Cuando el anticuerpo se produce recombinantemente, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos y reactivos, es decir, el anticuerpo de interés se separa de precursores químicos u otros productos químicos que participan en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % (por peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferida de la presente invención, anticuerpos están aislados o purificados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "niveles de bajos a indetectables de agregación" se refiere a muestras que contienen no más del 5 %, no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 %, no más del 1 % y frecuentemente no más del 0,5 % de agregación, en peso de proteína, como se mide por, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC).

Como se usa en el presente documento, el término "niveles de bajos a indetectables de fragmentación" se refiere a muestras que contienen igual o superior al 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, de la proteína total, por ejemplo, en un pico individual, como se ha determinado por HPSEC, o en dos (2) picos (cadena pesada y cadena ligera) por, por ejemplo, electroforesis en gel capilar reducida (rCGE) y que no contiene otros picos individuales que tengan más del 5 %, más del 4 %, más del 3 %, más del 2 %, más del 1 % o más del 0,5 % de la proteína total, cada uno. La rCGE como se usa en el presente documento se refiere a electroforesis en gel capilar bajo condiciones reductoras suficientes para reducir enlaces disulfuro en un anticuerpo o molécula derivada de tipo anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, los términos "estabilidad" y "estable" en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo contra CXCR5 o fragmento de unión del mismo se refieren a la resistencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación al desplegamiento térmico y químico, agregación, degradación o fragmentación en condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. Las formulaciones "estables" de la invención retienen actividad biológica igual a o superior al 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,5 % en condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. La estabilidad de dicha preparación de anticuerpo puede evaluarse por grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, rCGE, electroforesis en dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia.

El término, "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite

mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo adecuado cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones de dextrosa acuosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, depósitos y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. Como se conoce en la técnica, la formulación se construirá para adaptarse al modo de administración.

Los agentes de tamponamiento ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Los tampones están preferentemente presentes a una concentración que oscila de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Agentes de tamponamiento adecuados para su uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos, y sales de los mismos, tales como tampones citrato (por ejemplo, mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio, etc.), tampones succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato de disodio, etc.), tampones tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato de monosodio, mezcla de ácido fumárico-fumarato de disodio, mezcla de fumarato de monosodio-fumarato de disodio, etc.), tampones gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampones oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico, etc.). Pueden usarse tampones fosfato, tampones carbonato, tampones histidina, sales de trimetilamina tales como Tris, HEPES y otros tampones tales conocidos.

Pueden añadirse conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y pueden añadirse en cantidades que oscilan del 0,2 %-1 % (peso/volumen). Conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

Están presentes isotonicantes para garantizar la isotonicidad fisiológica de composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcar polihidroxilados, preferentemente alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Los alcoholes polihidroxilados pueden estar presentes en una cantidad de entre aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 25 %, en peso, preferentemente del 1 % al 5 % teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros componentes.

Estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que puede oscilar en función de un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquirosa, arabitól, eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, que incluyen ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol,  $\alpha$ -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, sacáridos, monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos, tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano, etc. Los estabilizadores están presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 peso/peso por parte de proteína activa.

Diversos excipientes adicionales incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina o vitamina E) y codisolventes.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede desearse proporcionar además un

agente inmunosupresor. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces con el fin previsto.

Como se usa en el presente documento, el término "tensoactivo" se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, concretamente, están compuestas de grupos de tendencias de solubilidad opuesta, normalmente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensoactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensoactivo, en tensoactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensoactivos frecuentemente se usan como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Pueden añadirse tensoactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, además de para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por la agitación, que también permite que la formulación se exponga a tensiones superficiales de cizallamiento sin causar desnaturalización de la proteína. Tensoactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), poloxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic® y monoéteres de polioxietilensorbitano (TWEEN-20®, TWEEN-80®, etc.). Los tensoactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferentemente aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Como se usa en el presente documento, el término "sal inorgánica" se refiere a cualquier compuesto, que no contiene carbono, que resulta de la sustitución de parte o todo el hidrógeno del ácido o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal, y frecuentemente se usa como un compuesto de ajuste de la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, etc.

La presente invención proporciona formulaciones líquidas de un compuesto de unión anti-CXCR5 o fragmento del mismo, que tiene un pH que oscila de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, o aproximadamente 5,5 a 6,5, o aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, o aproximadamente 6,0.

La presente invención engloba formulaciones líquidas que tienen estabilidad a temperaturas encontradas en un refrigerador y congelador comerciales encontrados en la consulta de un médico o laboratorio, tal como de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 5 °C, dicha estabilidad evaluada, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), para fines de almacenamiento, tales como durante aproximadamente 60 días, durante aproximadamente 120 días, durante aproximadamente 180 días, durante aproximadamente a año, durante aproximadamente 2 años o más. Las formulaciones líquidas de la presente invención también presentan estabilidad, como se evalúa, por ejemplo, por HSPEC, a temperatura ambiente, durante al menos algunas horas, tal como una hora, dos horas o aproximadamente tres horas antes de uso.

El término "molécula pequeña" y términos análogos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluyen compuestos hetero-orgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

Así, en el caso de cáncer, por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de cáncer tratamientos, que incluyen agentes quimioterapéuticos convencionales (paclitaxel, carboplatino, cisplatino y doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinib, erlotinib y cetuximab), agentes antiangiogénesis (bevacizumab y sunitinib), además de agentes inmunomoduladores, tales como interferón  $\alpha$  y talidomida.

En otra realización, en el caso de enfermedades reumáticas, tales como artritis reumatoide (AR), puede usarse una terapia de combinación que comprende una molécula de unión a CXCR de interés. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo contra CXCR5 humanizado con una molécula pequeña, tal como un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, metotrexato e inhibidores de la síntesis de piridina, tales como, leflunomida (Mader & Keystone, J Rheum 34 Supp(16-24) 2007, Gaffo et al., Am J Health Syst Pharm 63:2451-2465, 2006).

Debido a que diversas formas de una molécula de unión a CXCR5 de interés pueden ser no agotadoras de linfocitos B, la presente molécula puede combinarse con otros fármacos que tienen mecanismos de acción solapantes para dar un punto final aditivo o sinérgico. Por tanto, por ejemplo, un segundo fármaco puede ser uno que actúa al nivel de una citocina, en el eje de linfocitos T, etc.

Como se usa en el presente documento, los términos "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente que pueda usarse en el tratamiento, gestión o mejora de una enfermedad, trastorno, dolencia y similares asociados a metabolismo y actividad de CXCR5 y/o CXCL13 aberrantes. Esto puede manifestarse en



niveles de linfocitos B o actividad de linfocitos B anormales. También están incluidos compuestos conocidos con un efecto farmacológico en el tratamiento de un trastorno, etc., que está asociado con metabolismo y actividad de CXCR5 y/o CXCL13 aberrante.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas, véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente de EE.UU. N.º 5.314.995; y EPO 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo (por ejemplo, emisores  $\alpha$  tales como, por ejemplo,  $^{213}\text{Bi}$ ). Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo y decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, daunomicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, actinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico tal con anticuerpos son muy conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., en *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985); y Thorpe, et al., *Immunol Rev* 62:119 (1982). Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado, tal como un anticuerpo bifuncional, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.676.980.

Los conjugados de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral,  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I (documento WO 97/33899), AIM II (documento WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGF (documento WO 99/23105); un agente trombotico; un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración usando un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  o 0,22  $\mu\text{m}$ .

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o matrices. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxiethylmetacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. N.º 3,773,919), copolímeros de L-ácido glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables (tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Pueden ser ideadas estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, sustitución de aminoácidos y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

La composición de anticuerpo, o variante del mismo, se formulará, dosificará y administrará de un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos para los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o variante que va a administrarse estará gobernada por tales consideraciones, y puede ser la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad, afección o trastorno por CXCR5.

El anticuerpo, o variante del mismo, se formula opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como se usan anteriormente en este documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosis empleadas hasta la fecha.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad por CXCR5, mejorar uno o más síntomas de la misma, prevenir el avance de una enfermedad por CXCR5 o producir la regresión de una enfermedad por CXCR5, o que es suficiente para producir la prevención del desarrollo, reaparición, aparición o progresión de una enfermedad por CXCR5 o uno o más síntomas de la misma, o potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) y/o terapéutico(s) de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad por CXCR5. Por ejemplo, un tratamiento de interés puede reducir los elevados niveles de linfocitos B, basados en el nivel inicial o un nivel normal, al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 %. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente terapéutico o profiláctico reduce los síntomas de una enfermedad por CXCR5, tal como artritis o rechazo de injerto al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 %. También se usa en el presente documento como un equivalente el término "cantidad terapéuticamente eficaz".

La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será eficaz en el uso o tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede ser determinada por técnicas clínicas convencionales. Cuando sea posible, una curva de dosis-respuesta y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser primero derivadas *in vitro*. Si está disponible un sistema de modelo animal adecuado, otra vez puede obtenerse una curva de dosis-respuesta y usarse para extrapolar una dosis humana adecuada poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, basándose en el conocimiento común de la materia, una composición farmacéutica eficaz en promover una disminución de un efecto inflamatorio, por ejemplo, puede proporcionar una concentración de agente terapéutico local de entre aproximadamente 5 y 20 ng/ml, y, preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 ng/ml. En una realización específica adicional de la invención, una composición farmacéutica eficaz en mejorar el crecimiento y la supervivencia de células responsables de manifestaciones autoinmunitarias dependientes de linfocitos B o rechazo de injerto puede proporcionar una concentración de agente terapéutico local de entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 ng/ml.

En una realización preferida, una disolución acuosa de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse mediante inyección subcutánea. Cada dosis puede oscilar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o más preferentemente, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo peso corporal. La dosificación puede determinarse empíricamente para la enfermedad particular, población de paciente, modo de administración, etc., poniendo en práctica métodos farmacéuticos conocidos en la técnica.

El programa de dosis para administración subcutánea puede variar de una vez a la semana a diariamente dependiendo de varios factores clínicos, que incluyen el tipo de enfermedad, gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

La presente invención proporciona métodos de preparación de formulaciones líquidas del anticuerpo o fragmento de unión a CXCR5 del mismo, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción de anticuerpo purificado a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml o más usando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un corte de peso molecular (mw) apropiado (por ejemplo, corte de 30  $K_D$  para fragmentos  $F_{(ab)2}$  de los mismos; y corte de 10  $K_D$  para fragmentos  $F_{ab}$ ) y, opcionalmente, diafiltrando la fracción de anticuerpo concentrada en el tampón de formulación usando la misma membrana.

Además, la presente invención también engloba formulaciones líquidas estables, tales como de  $K_D$  estable, de los productos de interés que tienen semivida *in vivo* mejorada. Así, el anticuerpo de interés tiene una semivida en un sujeto, preferentemente un ser humano, superior a 3 días, superior a 7 días, superior a 10 días, superior a 15 días, superior a 25 días, superior a 30 días, superior a 35 días, superior a 40 días, superior a 45 días, superior a 2 meses, superior a 3 meses, superior a 4 meses, superior a 5 meses o más.

Para prolongar la circulación en suero de un anticuerpo *in vivo*, pueden usarse diversas técnicas. Por ejemplo, pueden unirse moléculas de polímero inerte, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, a un anticuerpo con o sin un conector multifuncional ya sea mediante conjugación específica de sitio del PEG al extremo

N o al extremo C del anticuerpo o mediante grupos amino  $\epsilon$  presentes en restos de lisina. Puede usarse derivatización de polímero lineal o ramificado que produce pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser estrechamente monitorizado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la apropiada conjugación de moléculas de PEG a los anticuerpos. Puede separarse PEG sin reaccionar de los conjugados de anticuerpo-PEG por exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Pueden probarse anticuerpos derivatizados con PEG para la actividad de unión, además de para la eficacia *in vivo* usando métodos conocidos para aquellos de experto en la materia, por ejemplo, por inmunoensayos descritos en el presente documento.

También puede generarse un anticuerpo que tiene una elevada semivida *in vivo* introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o deleciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión F<sub>c</sub>R del mismo (tal como un fragmento de dominio F<sub>c</sub> o F<sub>c</sub> bisagra), véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/23289; WO 97/34631; y la patente de EE.UU. N.º 6.277.375.

Además, puede conjugarse un anticuerpo con albúmina para producir un anticuerpo más estable *in vivo* o que tenga una semivida *in vivo* más larga. Las técnicas son conocidas en la técnica, véanse por ejemplo, los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y EPO 413, 622. El anticuerpo también puede modificarse, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloque conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc.

En una realización, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a los seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína u otro anestésico de "caína" para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición va a administrarse por infusión, puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Donde la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, por ejemplo, en un kit, de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

La invención también proporciona que una formulación líquida de la presente invención esté envasada en un envase sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad del producto de interés. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden estar en un envase sellado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida de la presente invención puede suministrarse en un envase sellado con al menos 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, o 300 mg/ml de anticuerpo contra CXCR5 en una cantidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, por ejemplo.

Se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Receptores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para diagnosticar, prevenir o tratar una afección o enfermedad por CXCR5 y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta sobre o asociada al recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

En otro aspecto de la invención, ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado a expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, a modo de terapia génica. Terapia génica se refiere a terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable de interés. En la realización de la invención, los ácidos nucleicos producen la proteína codificada en y por células hospedadoras diana que median en un efecto terapéutico. Puede usarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponible según la presente invención.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488 (1993); Wu et al., *Biotherapy* 3:87 (1991); Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:573 (1993); Mulligan, *Science* 260:926 (1993); Morgan et al., *Ann Rev Biochem* 62:191 (1993); y May, *TIBTECH* 11:155 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, o fragmentos de unión funcionales de los mismos, siendo dichas secuencias de ácidos nucleicos parte de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un

hospedador adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores operativamente unidos a la región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido, además de otras secuencias reguladoras.

5 En otra realización particular, se usan moléculas de ácidos nucleicos en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada, están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codificantes de anticuerpo (Koller, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:8932 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435 (1989)). En realización específica, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; 10 alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo. Métodos alternativos de integración incluyen usar factores de transcripción particulares que reconocen secuencias de ácidos nucleicos específicas, dedos de cinc, etc.

La administración de los ácidos nucleicos en un paciente puede ser o bien directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vectores que llevan ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, luego se trasplantan en el paciente.

15 En una realización, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo* y se expresan para producir el producto codificado. Eso puede llevarse a cabo por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyendo las secuencias codificantes de anticuerpo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrando el mismo, de manera que los vectores lleguen a ser intracelulares, por ejemplo, por infección usando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros virales (véase la patente de EE.UU. N.º 4.980.286), por inyección directa de ADN desnudo, por uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes: Biolistic, Dupont), usando vectores no virales, tales como composiciones sintéticas que comprenden un compuesto anfipático que se une al ácido nucleico hidrófilo y tiene la capacidad para fusionarse con células, conteniendo así generalmente una porción hidrófoba para combinar con membranas, recubrimiento con 20 lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, administrando el vector en conexión a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrando el vector en conexión a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)) (que puede usarse para dirigir tipos de célula diana que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper los endosomas, que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la captación y expresión específica de células, dirigiendo un receptor específico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188 y WO 93/20221).

Con respecto a los vectores, por ejemplo, puede usarse un vector lentiviral como se conoce en la técnica. Los vectores lentivirales contienen componentes para encapsidar el genoma viral e integración en el ADN de célula 35 hospedadora. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo que va a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, que facilitan la administración del gen en un paciente. Por ejemplo, puede usarse un vector lentiviral para administrar un transgén a células madre hematopoyéticas. Referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., J Clin Invest 93:644 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467 (1994); Salmons et al., Human Gene Therapy 4:129 (1993); y Grossman et al., Curr Opin Gen and Dev 3:110 (1993).

40 También pueden usarse adenovirus en la presente invención. Dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo, por ejemplo. Los adenovirus infectan células no en división, una ventaja con respecto a los vectores retrovirales tempranos. Kozarsky et al., Curr Opin Gen Dev 3:499 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Pueden encontrarse otros casos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld et al., Science 252:431 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143 (1992); Mastrangeli et al., J Clin Invest 91:225 (1993); documento WO94/12649; y Wang et al., Gene Therapy 2:775 (1995).

También puede usarse virus adenoasociados (AAV) en terapia génica (Walsh et al., Proc Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); y las patentes de EE.UU. N.º 5.436.146; 6.632.670; y 6.642.051).

50 Otro enfoque para terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejido por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células se disponen entonces bajo selección para aislar aquellas células que han sido captadas y están expresando el gen transferido. Aquellas células se administran entonces a un paciente.

55 Así, el ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión de células, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la

introducción de genes extraños en células (véanse, por ejemplo, Loeffler et al., Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen et al., Meth Enzymol 217:618 (1993); y Cline Pharm Ther 29:69 (1985)) y pueden usarse según la presente invención, a condición de que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el

5 ácido nucleico se exprese por la célula, heredable y expresada por la progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Se administran glóbulos sanguíneos recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o progenitoras) preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

10 Células en las que puede introducirse un ácido nucleico para los fines de terapia génica engloban cualquier tipo de célula disponible deseado, e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células de músculo, hepatocitos, glóbulos sanguíneos, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y granulocitos; diversas células madre o progenitoras, por ejemplo, como se obtienen de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

15 En una realización, la célula usada para terapia génica es autóloga al paciente. Se introducen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención en las células de forma que el transgén sea expresado por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran entonces *in vivo* para efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede ser posiblemente usada según la realización de la

20 presente invención (véanse, por ejemplo, el documento WO 94/08598; Stemple et al., Cell 71 :973 (1992); Rheinwald Meth Cell Bio 21A:229 (1980); y Pittelkow et al., Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)). Debido a que CXCR5 se expresa en, por ejemplo, linfocitos B, son células hospedadoras adecuadas glóbulos sanguíneos y células de la médula ósea. Sin embargo, el alcance de la presente invención referente al uso de células madre hospedadoras no contempla la preparación y el uso de un transgén para producir un organismo transgénico administrando el transgén

25 de interés a embriones y células madre embrionarias.

La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de enfermedades por CXCR5 o uno o más síntomas de las mismas administrando a un sujeto una cantidad eficaz de, por ejemplo, una formulación líquida de la invención. El sujeto es preferentemente un mamífero tal como no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono, tal como un mono cinomolgo, y un ser humano).

30 En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

CXCR5 también se expresa en ciertas células cancerosas, tales como páncreas, colon y vejiga, además de en leucemias de linfocitos T (Qinping et al., Oncogene 24:573-584, 2005) y leucemias de linfocitos B (Burkel et al., Blood, Jul 2007; doi:10.1182/blood-2007-05-089409) y la estimulación de CXCR5 se correlacionó con la proliferación de células de carcinoma, Meijer et al., Cane Res 66:9576-9582, 2006.

35 Así, el anticuerpo o derivado del mismo de interés puede usarse para controlar la proliferación de células cancerosas que expresan CXCR5, cánceres que se identifican determinando la presencia de expresión de CXCR5 por un ensayo de diagnóstico enseñado en el presente documento. El anticuerpo de interés puede reducir la infiltración de células malignas, reducir la resistencia a la apoptosis y minimizar la proliferación. Tales pacientes son entonces administrados con una cantidad inhibidora de la proliferación de células de cáncer de un anticuerpo, o

40 derivado del mismo, de interés como se proporciona en el presente documento.

Los trastornos autoinmunitarios están asociados a expresión aberrante y/o alta de CXCL13, tales como lupus (Ishikawa et al., J Exp Med 193:1393-1402, 2001) y síndrome de Sjögren (Salomonsson et al., Scan J Imm 55:336-342, 2002; y Barone et al., Arth Rheum 52(6):1773-1784, 2005), o alta expresión de CXCR5, tal como en miastenia grave (Sims et al., J Imm 167:1935-1944, 2001; Saito et al., J Neuroimm 55:336-342, 2005; y Tackenberg et al., Eur J Imm 37:849-863, 2007). Por tanto, se usa un anticuerpo de interés para minimizar el efecto de altos niveles o alta actividad de CXCL13 o ligando de CXCR5. En trastornos autoinmunitarios caracterizados por altos niveles de linfocitos B, altos niveles de CXCR5 o altos niveles de CXCL13, u otro ligando de CXCR5, se administra una cantidad inhibidora de la actividad de linfocitos B de un anticuerpo de interés como se enseña en el presente documento.

50 Se observa expresión de CXCR5 aberrante en esclerosis múltiple, Brain 129(pt 1):200-211, 2006.

En colitis, CXCR5 tiene una función en la formación y función de GALT (Carlsen et al., Gut, 2002, 51(3):364-367). La migración e infiltración mediada por CXCR5 de linfocitos B en la lámina propia del intestino e infiltración de la mucosa en general (Mazzucchelli et al., J Clin Invest, 1999, 104(10):R49-R54) y expresión del mismo en lesiones de colitis ulcerosa que contienen centros germinales ectópicos se inhibe por un anticuerpo de interés.

55 El agotamiento de linfocitos B puede ser de beneficio terapéutico en mejorar los síntomas en ciertas circunstancias y en ciertas indicaciones, tales como en artritis reumatoide (Oligino & Dalrymple, Arth Res Ther 5(suppl 4):S7-S11, 2003). CXCR5 se expresa a altos niveles en el tejido sinovial de pacientes con artritis, en comparación con el tejido de individuos no afectados con artritis reumatoide (Schmutz et al., Arth Res Ther 7:R217-R229, 2005). Así, ciertas

formas del presente anticuerpo, y derivados del mismo, pueden agotar las poblaciones de linfocitos B, y pueden prevenir la infiltración e interacción de linfocitos B en una articulación. Por consiguiente, un tratamiento puede incluir administrar una cantidad reductora de los niveles de linfocitos B de un anticuerpo de interés a un paciente diagnosticado con artritis. El anticuerpo puede administrarse localmente a la articulación afectada.

5 Se observa neogénesis linfoide ectópica en varias condiciones, que incluyen artritis psoriásica (Canete et al., Ann Rheum Dis, Jan 12, 2007, doi:10.1136/ard.2006.062042), enfermedades inflamatorias crónicas, en general (Aloisi & Pujol-Borrell, Nat Rev Imm 6:205-217, 2006) y en injertos que experimentan rechazo, tanto crónico (Baddoura et al., Am J Trans 5:510-516, 2005) como agudo (DiCarlo et al., Am J Trans 7:201-210, 2007). CXCL13 y CXCR5 estaban presentes en injertos cardíacos (DiCarlo et al, arriba); y CXCL13 estaba presente en artritis psoriásica (Canete et al., arriba). La presencia de CXCL13 y/o CXCR5 está asociada al desarrollo de los folículos linfoides ectópicos con áreas de linfocitos B y linfocitos T, como se encuentran en nodos normales. La presentación de antígenos de linfocitos B de aloantígeno también se asoció a modelo de aloinjerto cardíaco agudo (Noorchashm et al., J Imm 177:7715-7722, 2006).

15 Así, puede usarse un anticuerpo de interés para disminuir la inflamación y rechazo de injerto. Un paciente se administra entonces con una cantidad inhibidora de la actividad de linfocitos B de un anticuerpo para disminuir la inflamación, para minimizar el desarrollo de centros germinales ectópicos, para minimizar el reclutamiento de linfocitos B a un injerto y para minimizar la presentación de aloantígenos de linfocitos B antes o tras un procedimiento de trasplante.

20 La invención se ejemplificará ahora para el beneficio del experto por los siguientes ejemplos no limitantes que representan algunas de las realizaciones por y en las que la presente invención puede ponerse en práctica.

### Ejemplos

#### EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE INMUNOGÉN

25 Pueden producirse anticuerpos monoclonales anti-CXCR5 contra células CHO transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y se expresa sobre la superficie celular ("r-CXCR5-células CHO"). La secuencia de CXCR5 usada para transformar las células

Se puso el marco de lectura abierto de CXCR5 en un vector de expresión, tal como pCDNA3.1neo\_DEST, y luego se transfeció en células 300-19 (Immunogen).

30 Por tanto, el dominio EC de CXCR5, con la secuencia de aminoácidos, MNYPTLEMDLENLEDFWELDRLDNYNTSLVENHLC (SEQ ID NO: 1), se conjugó con KLH por la cisteína del extremo C, y se usó como inmunogén. Se administraron IP células que expresan CXCR5 o el dominio EC de CXCR5 ( $5 \times 10^6$  células en 0,2 ml o 50 µg péptidos en 100 µl de tampón, opcionalmente mezcladas con 100 µl de adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund). Se repitieron las inyecciones con el antígeno cada dos semanas hasta que se detectó anticuerpo contra CXCR5 de alto título en el suero usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos, por ejemplo, por ELISA o FACS usando, por ejemplo, células CXCR5<sup>+</sup>, que pueden aislarse, por ejemplo por FACS, y, por ejemplo, el MAB190 comercialmente disponible (R & D Systems) como control positivo.

40 Las células que expresan CXCR5 se mantuvieron a 37 °C bajo 5 % de CO<sub>2</sub> en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) dializado (Invitrogen). Las células se prepararon para inyección sustituyendo el medio de cultivo anterior con solución salina tamponada con fosfato (libre de Ca/Mg) (CMF-PBS) complementada con EDTA 5 mM, y recogiendo las células en ese tampón. Las células recogidas se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante aproximadamente 5 minutos, se lavaron una vez resuspendiendo el sedimento en CMF-PBS y centrifugando como antes, se contaron y se ajustaron al volumen apropiado (tal como  $5 \times 10^6$  células en 0,2 ml) para inyección resuspendiendo el sedimento de células en CMF-PBS.

45 Como se ha mencionado, se monitorizó la expresión de CXCR5, por ejemplo, por análisis de FACS, usando anticuerpos contra CXCR5 comercialmente disponibles, tales como MAB190 (R & D), clon RF8B2 y 2G8 (2G8 es un anticuerpo de rata anti-CXCR5 de ratón, mientras que los otros anticuerpos comprados son anticuerpos anti-CXCR5 humano) (BD) y 2C1 (Abnova), además de diversos anticuerpos policlonales dirigidos a hCXCR5 preparados poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica.

50 Para facilitar la construcción del plásmido y para potenciar la expresión de CXCR5, se generaron oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de péptidos conductora que comprende los primeros 135 pares de bases de la secuencia codificante de ácidos nucleicos de CXCR5. Los oligonucleótidos contuvieron algunos cambios en las posiciones codificantes de titubeo para reducir el contenido de GC. Todos los cambios de la secuencia de nucleótidos fueron silenciosos, es decir, no resultaron cambios de secuencias de aminoácidos. Después de hibridar los oligonucleótidos juntos, la secuencia codificante de péptidos conductora manipulada se unió al resto de la secuencia codificante por PCR-SOE (Ho et al., Gene 77:51 (1989); y Horton et al., BioTechniques 8:528 (1990)).

Se verificó la expresión de CXCR5 antes del uso como inmunogén. Las células se cultivan en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene 10 % de FBS, 0,2 mM de glutamina y 1 x disolución de aminoácidos no esenciales, seguido de siembra a aproximadamente  $3-5 \times 10^5$  células por pocillo en un matraz T75 y cultivo durante aproximadamente 24-48 horas.

- 5 Las células transformadas o transfectadas se cultivaron durante aproximadamente dos semanas hasta que las células que no llevaban el plásmido de expresión de CXCR5 se eliminaron por selección con antibióticos. Pueden lisarse las células de las líneas celulares estables, obtenerse proteínas y someterse a análisis de transferencia Western.

10 Se ensayaron células transfectadas estables o transitorias para la expresión de CXCR5 usando métodos de detección de la expresión en la superficie celular de CXCR5, tal como por análisis FACS. Alternativamente, pueden lisarse células y estudiarse las proteínas, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Las células transfectadas recogidas de placas de cultivo se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en agua desionizada, se mezclaron con un volumen igual de 2 x tampón de carga de muestra de proteína (BioRad, Hercules, CA) y luego se calentaron a aproximadamente 100 °C durante 10 minutos. Se analizó la proteína de membrana usando medio acondicionado mezclado con un volumen igual de 2 x tampón de carga de muestra de proteína y se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Las muestras se separaron usando 4-12 % de gradiente SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA) (que se bloqueó con 5 % de leche en polvo desnatada en PBST (PBS con 0,05 % de Tween-20®) durante al menos una hora antes de la transferencia de proteína.

20 Se detectó CXCR5 incubando la membrana con anticuerpo primario específico de CXCR5 en tampón de bloqueo durante al menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lavó al menos tres veces y se añadió un anticuerpo secundario conjugado con indicador en tampón de bloqueo a la membrana y se incubó durante al menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lavó tres veces en PBST y se desarrolló con, por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente.

25 **EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE mAb ANTI-CXCR5**

Se inmunizaron ratones A/J o BALB/cJ, aproximadamente 4-6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con las células transfectadas con CXCR5 o un péptido de EC. Se sensibilizaron por vía intraperitoneal un grupo de ratones en el día 0 con una emulsión 1:1 de péptido conjugado con KLH mezclado con adyuvante (CFA), se reforzaron ip en el día 20 con los péptidos con IFC (adyuvante incompleto de Freund) y/o células en PBS sin adyuvante, y finalmente se reforzaron por vía intravenosa en el día 44 con los péptidos KLH mezclados en IFC y/o células en PBS, sin adyuvante. Otro grupo de ratones se sensibilizaron ip en el día 0, se reforzaron ip en los días 15, 30, 53 y 67, y finalmente se reforzaron por vía intravenosa en el día 81 (todas las inyecciones con células en PBS, sin adyuvante). Para ambos grupos de ratones, cada inyección contuvo aproximadamente  $3 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  células en un volumen de aproximadamente 200  $\mu$ l. Alternativamente, se realizaron inmunizaciones con péptido y/o célula una vez cada dos semanas, 3-6 veces hasta que se obtuvo un título anti-CXCR5 deseable, como se determina, por ejemplo, por análisis de FACS o ELISA.

35 Tres días después de la última inyección, los ratones se probaron opcionalmente para el título de anticuerpos anti-CXCR5 en suero, se sacrificaron y el bazo se extirpó y se puso en aproximadamente 10 ml de DMEM libre de suero (Gibco) en una placa de Petri. Los esplenocitos se separaron de la cápsula usando pinzas y se lavaron dos veces en 10 ml de IMDM libre de suero (Cellgro, Herndon, VA) a 37 °C. Se transfirieron las suspensiones de células del bazo a un tubo de fondo cónico de 15 ml y se dejó que el residuo sedimentara durante aproximadamente 2-5 minutos. El sobrenadante que contenía los esplenocitos se transfirió a un tubo de fondo cónico nuevo de 15 ml y se lavó tres más veces con IMDM hasta la fusión. Pueden reunirse las células del bazo de ratones.

40 Opcionalmente, se preparó una suspensión de 5 ml de células sueltas de células nodrizas del bazo de control a partir de un ratón no inmunizado esencialmente como se ha descrito anteriormente para las células del bazo inmunizadas y se puso en una estufa de incubación (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) hasta que se necesitó.

45 El componente de fusión para las células del bazo inmunizadas puede ser una línea de células de mieloma no secretora sensible a hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT), tal como P3X63-AG8.653 o SP2/0 (ATCC, Manassas, VA) o linfoblastos FO\_B (ATCC, CRL-1646)). Antes de las fusiones, las células linfoides se mantuvieron en 50 IMDM/10 % de FBS (37 °C, 7 % de CO<sub>2</sub>) asegurando que las células estuvieran en fase de crecimiento logarítmico en el día de la fusión. Un mecanismo de selección alternativo se basa en usar azaserina, que normalmente se añade un día después de la fusión.

55 El protocolo de fusión usado es un híbrido de los protocolos expuestos en Lerner (Yale J Biol Med, 1981, 54(5)387-402) y Gefter et al. (Somatic Cell Genet, 1977, 3(2)231-236). Antes de la fusión, las células del bazo reunidas se lavaron tres veces con IMDM sin suero, y se contaron. Por tanto, inmediatamente antes de la fusión, se lavaron tres veces las células de mieloma en fase logarítmica con IMDM sin suero y se contaron. Las células linfoides se resuspendieron a  $1 \times 10^7$  células/ml en IMDM sin suero. Para cada fusión, se mezclaron  $1-1,5 \times 10^8$  células del bazo con  $1-3 \times 10^7$  células de mieloma en un tubo de polipropileno de fondo cónico de 50 ml, y las células se lavaron una

vez con IMDM sin suero. La relación de células del bazo con respecto a células de mieloma fue 5:1. Los tubos se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos para sedimentar las células. Después de la aspiración de los sobrenadantes, los sedimentos se resuspendieron suavemente dando golpecitos en el fondo de los tubos. Los tubos se dispusieron entonces en un vaso de precipitados de agua a 37 °C. Todas las etapas de fusión posteriores se

llevaron a cabo en ese vaso de precipitados.

A continuación, se añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol 1500 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) precalentado a 37 °C a cada sedimento de células durante el transcurso de aproximadamente 1 minuto, mientras que se balanceaba suavemente el tubo. Las células se incubaron en el PEG durante aproximadamente un minuto seguido por la adición de un ml de IMDM sin suero añadido gota a gota a cada sedimento durante el transcurso de 30 segundos, y luego se añadieron 9 ml de IMDM sin suero a cada sedimento durante el último minuto. Ambos tubos se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y los sobrenadantes se aspiraron. El sedimento de células se resuspendió en 100 ml de medio de producción de hibridomas completo filtrado (500 ml de IMDM (Cellgro) mezclado con 10 % de FBS (SeraCare, Millford, MA), 0,2 mM de L-glutamina, 1 x disolución de aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, 0,01 % de pen-estrep (Invitrogen) y 1X suplemento de HT (Invitrogen)).

Cada 100 ml de suspensión de células se sembraron en diez placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos, con un volumen de ~100 µl/pocillo. Las placas se mantuvieron en una estufa de incubación a 37 °C, 7 % de CO<sub>2</sub>. En el día 2 después de la fusión, las células se seleccionaron mediante la adición de azaserina 5,7 µM en IMDM a las células fusionadas a 100 µl por pocillo. Los sobrenadantes se extrajeron para el cribado primario, normalmente en los días 10-14 después de la fusión, de los pocillos que contenían los clones. La eficiencia de fusión fue del 75-99 % (720-950 de los 960 pocillos posibles desarrollaron clones que se cribaron).

El cribado primario puede ser un radioinmunoensayo (RIA) diseñado para detectar anticuerpos que se unen a CXCR5 humano. Para realizar el RIA, se añade IgG de cabra anti-ratón purificada por afinidad (específica del fragmento F<sub>c</sub>) (Cappell, Cochranville, PA) en PBS a placas de microtitulación de PVC de 96 pocillos (50 µl/pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. La IgG de cabra anti-ratón se retira de las placas y los pocillos se bloquean con 100 µl/pocillo de 5 % de FCS/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de retirar la disolución de bloqueo, se añade sobrenadante de cultivo de hibridoma puro a los pocillos (50 µl/pocillo) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20. A continuación, se añaden 50 µl de <sup>125</sup>I-CXCR5 (~20.000 cpm) en PBS/5 % de FCS a cada pocillo, y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan 3 veces con PBS/0,05 % de Tween-20. Después de sacudir todo el tampón de lavado, los pocillos se separan cortando las placas y se analizan en un contador gamma. Los pocillos a los que se añade 5 % de FCS/PBS en lugar de sobrenadante de cultivo sirvieron de pocillos de referencia.

El CXCR5 purificado se marca con <sup>125</sup>I según el método de Bolton-Hunter, sustancialmente como se describe por el proveedor del reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA). La calidad de <sup>125</sup>I-CXCR5 se monitoriza confirmando que el procedimiento de marcado no destruyó los epítopes reconocidos por los anticuerpos contra CXCR5 comercialmente disponibles (R & D o Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Se considera que los clones son positivos en el cribado primario si muestras de sobrenadante se marcan aproximadamente 10 veces por encima del nivel de fondo en el RIA. Se sacan los clones positivos, se expanden y se guardan congelados.

Se diseñó un cribado de hibridoma primario para determinar si los anticuerpos reconocieron epítopes de CXCR5 nativos. Esto se llevó a cabo por análisis de FACS de CXCR5 de la superficie celular presentado sobre células CXCR5<sup>+</sup> teñidas con los anticuerpos monoclonales, visualizando la unión con el segundo anticuerpo de cabra anti-ratón marcado fluorescentemente. Se consideró que los clones eran positivos en el cribado primario si las muestras de sobrenadante se marcaron aproximadamente 10 veces por encima del nivel de fondo en el análisis de FACS. Por tanto, para localizar los epítopes de CXCR5 unidos por anticuerpos, se realizaron ensayos de competición con anticuerpos contra CXCR5. Se seleccionaron clones positivos, se expandieron y se congelaron.

### EjemPlo 3: ENSAYOS DE UNIÓN BASADOS EN CÉLULAS PARA mABS ANTI-CXCR5

Se usó un ensayo de unión basado en células para caracterizar el mAb anti-CXCR5. Por ejemplo, pueden usarse las células transfectadas que expresan CXCR5 descritas anteriormente, tales como hCXCR5/HEK293. Se clonó un marco de lectura abierto de CXCR5 humano de longitud completa en un vector, por ejemplo, pCDNA3.1neo DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se sintetizó la región codificante de CXCR5 por RT-PCR usando cerebro humano y ARN de hígado (Ambion, Inc., Austin, TX) como molde. La construcción de plásmido final, CXCR5/CDNA3.1neo, expresó una proteína CXCR5 de longitud completa. Se generó una línea celular estable que expresa CXCR5 por transfección de la construcción de plásmido CXCR5/pCDNA3.1neo en células CHO o HEK293 (ATCC N.º CRL-1573) usando un kit Lipofectamine 2000 estándar y comercialmente disponible. Después de la transfección, las células se cultivaron en DMEM durante la noche, luego volvieron a sembrar en medio con 200 µg/ml de neomicina y se cultivaron durante 12-14 días. Se recogieron colonias individuales aisladas y se cultivaron en pocillos separados hasta que se amplificaron suficientes células clonales. Se identificaron clones estables resistentes a neomicina y que



expresaron altos niveles de proteína CXCR5 por análisis de FACS usando anticuerpos anti-CXCR5 policlonales (R&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpos policlonales generados a medida.

También se confirmaron células HS Sultan humanas (ATCC N.º CRL-1484) que expresan naturalmente CXCR5 para la expresión de CXCR5 por análisis de FACS. Se cultivaron células HS Sultan en RPMI 1640 que contenía 10 % de suero de ternero fetal, 0,2 mM de glutamina y 0,1 % de disolución de pen/estrep (100 µg/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomina).

Puede evaluarse la unión de anticuerpos basada en células usando el sistema de detección celular FMAT™ (cribado de alto rendimiento macro-confocal con fluorescencia) 8100 HTS o 8200 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se sembraron líneas celulares que expresan naturalmente CXCR5 o se transfectaron establemente con construcciones de expresión de CXCR5 en placas de 96 pocillos. Alternativamente, se siembran células 293T o CHO transitoriamente transfectadas en la placa de 96 pocillos. Las células se siembran a una densidad de 5.000-30.000 células por pocillo. Después de 20-24 horas, se añaden juntos mAb anti-CXCR5 y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FMAT a los pocillos y se incuban durante 1 h, 2 h, 4 h o durante la noche a temperatura ambiente.

También se evaluó la unión de anticuerpo basada en células por FACS usando una línea celular estable HEK293/CXCR5 que expresa CXCR5. Se incubaron células con mAb anti-CXCR5 en PBS. Después de tres lavados, las células se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con molécula fluorescente (BD Sciences, Palo Alto, CA).

El resultado indicó que varios mAb se unen a CXCR5 expresado de cualquier construcción de plásmido recombinante. Por ejemplo, se probaron los clones 11D6, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6, 79B7 y 16D7, además de variantes humanizadas del último anticuerpo, 16D7, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC1-LC1 y 16D7-HC2-LC1, un anticuerpo contra IL13 de control negativo, CA13, controles positivos, MAB190, 2C1 y RF8B2, tres controles de isotipo de ratón para IgG1, IgG2a e IgG2b y un control de isotipo de rata IgG2b (se corresponde con RF8B2) para la unión a células HEK293 transfectadas para expresar CXCR5. Los anticuerpos de control positivo 2C1 y MAB190 se unen a las células CXCR5. RF8B2 presentó niveles de unión intermedios. Los anticuerpos de control negativo solo presentaron unión de fondo. Todos los anticuerpos, excepto CA13, se unieron a las células hCXCR5/HEK293 con perfiles de unión y cinéticas de valoración similares a las del anticuerpo parental 16D7 y a las de 79B7.

También se tiñen células HEK293 transitoriamente transfectadas que contienen un plásmido CXCR5/neo con inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente y se observan por microscopía fluorescente. Los análisis de FMAT y FACS basados en células confirman que los mAb de hecho se unen a CXCR5 expresado ya sea de construcciones de plásmido recombinantes o como proteína nativa en células cultivadas. Se determina una señal de unión positiva basada en la lectura de señales de FMAT que es significativamente superior a la unión de fondo y otros clones de hibridoma negativos ( $p > 0,01$ ).

Los mAb contra CXCR5 generados, tales como 16D7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6 y 79B7, se unen al dominio EC y bloquean la unión de CXCL13 a CXCR5 en la célula.

#### EJEMPLO 4: ANÁLISIS DE AFINIDAD BIACORE

Se sintetizaron la región EC del extremo N de CXCR5 (aminoácidos 1-59) de ser humano y ratón con una marca de biotina terminal, y se usaron en un ensayo Biacore de formato directo donde los péptidos se inmovilizaron sobre un chip Biacore y luego se determinó la cinética de la interacción del anticuerpo con los péptidos sobre el chip. Los péptidos sintéticos se inmovilizaron sobre un chip de Biacore durante aproximadamente 20 unidades de respuesta (UR). Entonces, los mAb se expusieron al chip para las mediciones cinéticas, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

El clon de mAb anti-hCXCR5 de ratón, 16D7, tuvo una  $K_D$  calculada de  $2,16^{-12}$  M; 16D7 quimérico de IgG4 de ratón/humano (regiones VH y VL de 16D7 injertadas en un Fc de IgG4 humana, cuya secuencia es conocida en la técnica, opcionalmente optimizada en codones, usando métodos convencionales, tales como clonación, amplificación de extremos, determinación de la masa de las regiones y clonación de las porciones) tuvo una  $K_D$  de  $1,41^{-12}$  M; y para diversas variantes humanizadas de 16D7, en las que la estructura de las variantes y la derivación de las cadenas pesadas y ligeras de las mismas se indica por los términos, "HC\_" para una cadena pesada particular y "LC\_" para una cadena ligera particular, que se injertan en un esqueleto de IgG4, donde la composición de las cadenas se proporciona en el presente documento a continuación, 16D7-HC1-LC1 tuvo una  $K_D$  de  $3,11^{-12}$  M; 16D7-HC1-LC2 tuvo una  $K_D$  de  $1,41^{-12}$  M; 16D7-HC2-LC1 tuvo una  $K_D$  de  $2,40^{-12}$  M; 16D7-HC1-LC3 tuvo una  $K_D$  de  $1,21^{-12}$  M; 16D7-HC3-LC4 tuvo una  $K_D$  de  $4,92^{-12}$  M; 16D7-HC3-LC5 tuvo una  $K_D$  de  $1,84^{-10}$  M; y 16D7-HC1-LC6 tuvo una  $K_D$  de  $9,17^{-11}$  M.

SAR113244 humanizado, una forma de la variante humanizada de 16D7, 16D7-HC1-LC3, que lleva las sustituciones S241P y L248E (sustituciones introducidas poniendo en práctica métodos y reactivos conocidos, usando numeración de Kabat), se capturó en un chip de Biacore por anticuerpo anti-Fc de IgG humana de ratón pre-inmovilizado, y luego se usó en un ensayo Biacore de formato de ensayo inverso donde se determinó la cinética de la interacción

del péptido del extremo N de CXCR5 humano sin marcar (aminoácidos 1-59) con los mAb sobre el chip. Se determinó que  $K_D$  para SAR113244 era  $1,13 \pm 0,08^{-11}$  M. Los valores de  $K_D$  determinados con el ensayo directo usando péptido humano biotinilado inmovilizado sobre la superficie del chip y SAR113244 como analito estuvieron de acuerdo con aquellos obtenidos usando el ensayo inverso.

#### 5 EJEMPLO 5: ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA WESTERN DE ACTIVIDAD DE UNIÓN DE mAb ANTI-CXCR5

Se realizó transferencia Western para evaluar la actividad de unión de mAb anti-CXCR5 a CXCR5 en condición desnaturizante, además de los niveles de expresión de CXCR5 y otra proteína relacionada con CXCR5 en líneas celulares humanas. También se prepararon muestras de proteína a partir de células establemente transfectadas usando el kit de reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (Pierce, Rockland, IL, Cat. N.º 78501) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se calentó a 70 °C durante 10 minutos después de añadir un volumen igual de 2 x tampón de carga de muestra de proteína. Todas las muestras se separaron por electroforesis en un gradiente al 4-12 % de gel de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF y se aplicaron mAb anti-CXCR5 a la membrana de transferencia Western como el anticuerpo de detección primario. Se usó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 680 para la detección y las membranas se barrieron usando el sistema de obtención de imágenes de infrarrojos Odyssey (Li-cor, Lincoln, Nebraska) o usando electroquimioluminiscencia (ECL). Se generaron anticuerpos contra CXCR5 humano de control positivo como se enseña en el presente documento.

#### 20 EJEMPLO 6: ENSAYO DE FACS PARA MONITORIZAR LA INTERNALIZACIÓN DE CXCR5

Se obtienen células de capa leucocitaria de voluntarios sanos (Gulf Coast Blood Center, Houston, TX). Se aíslan células mononucleares periféricas humanas (CMSP) con un método de gradiente estándar de Ficoll-Hypaque. Se cultivan CMSP ( $0,5 \times 10^6$  células/pocillo) en placa de 96 pocillos a 4 °C. Cada pocillo contiene 0,2 ml de RPMI 1640 complementado con 10 % de FBS en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales (10 µg/ml). Después de 30 minutos, el medio se sustituye por RPMI 1640 frío fresco complementado con 10 % de FBS y sin anticuerpos. Las células se transfieren a una cámara de cultivo de tejido humidificada a 37 °C que contiene 5 % de CO<sub>2</sub>. Se recogen inmediatamente células tratadas con anticuerpo monoclonal, 2 h o 24 h después de transferir las células a 37 °C. Las células se lavan una vez con PBS y se incuban en PBS frío que contiene 1 % de BSA (PBSB) durante 30 minutos. Entonces, las células se tiñen con anti-CXCR5 humano conjugado con PE (BD Biosciences). Después de 30 minutos, las células se lavan 3 veces con PBSB y se fijan en 1 % de disolución de paraformaldehído durante la noche. Al día siguiente, se analiza la presencia de CXCR5 con un citómetro de flujo del sistema BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

#### 25 EJEMPLO 7: ENSAYO FLIPR

Se midieron cambios en el calcio intracelular sembrando 9000 células/pocillo e incubando durante la noche. Las células fueron la línea RBL-2H3 establemente transfectada con CXCR5 humano. Entonces se lavaron las células y entonces se cargaron con fluo-4/AM 2 mM (Molecular Probes) en un tampón que contenía probenicid 2,5 mM. Las células se expusieron al mAb contra CXCR5, luego se lavaron con tampón de ensayo. Las células se expusieron a CXCL13 10 nM (R & D). Se registraron los cambios en el Ca<sup>+2</sup> intracelular usando el dispositivo 384-B FLIPR (Molecular Devices). Se usaron mAb anti-CXCR5 humano comercialmente disponibles, e IgG1 e IgG2b de ratón como controles.

Como se trata en el presente documento más adelante, se construyeron varias versiones humanizadas del mAb 16D7, tales como 16D7 quimérico (la quimera hIgG<sub>4</sub>), 16D7-HC1-LC1, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC2-LC1, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC3-LC4, 16D7-HC3-LC5 y 16D7-HC1-LC6, y se probaron para actividad biológica como se demuestra por el flujo de calcio.

Los anticuerpos humanizados, aparte de un control negativo, CA13, demostraron actividad neutralizante de señales igual a la del anticuerpo 16D7 parental en células establemente transfectadas que expresan CXCR5.

#### 45 EJEMPLO 8: ENSAYO DE QUIMIOTAXIS

Se añadieron células HS Sultan de CXCR5<sup>+</sup> (ATCC CRL1484) a la cámara superior de una placa Transwell (Millipore) a  $0,5 \times 10^6$  células/pocillo en presencia de CXCL13 100 nM (R & D) o tampón CTX (RPMI sin rojo de fenol, que contiene 1 % de FBS, 0,5 % de BSA y piruvato de Na 1 nM) y se evaluó las células que migraron a la cámara inferior. Las dos cámaras se ensamblaron y se incubaron durante dos horas. Se contaron las células en la cámara inferior después de añadir el reactivo colorimétrico (Promega) y leer a DO<sub>490</sub>.

Se determinó la migración específica de CXCR5 como la diferencia entre el número total de células migradas y el número de células que migran espontáneamente. Si se prueba un anti-CXCR5, las células se incuban con el anticuerpo durante 30 minutos antes de añadirlas a la cámara superior. El grado de inhibición de anticuerpo es la relación de la migración específica en presencia de anticuerpo con respecto a la cantidad de migración en ausencia de anticuerpo. Esa relación puede multiplicarse por 100 % para dar una medida del porcentaje de inhibición.

Se compararon los anticuerpos del Ejemplo 7 con el anticuerpo 16D7 parental para la capacidad para neutralizar la quimiotaxis. Todos los anticuerpos humanizados, aparte del mAb CA13 de control negativo, neutralizaron la quimiotaxis en un perfil comparable al de 16D7 y 79B7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6. MAB190 de R&D tuvo actividad intermedia mientras que H28 y el anticuerpo 2C1 de Abnova no neutralizaron completamente la migración de células inducida por ligando.

#### EJEMPLO 9: ENSAYO DE REACTIVIDAD DE LINFOCITOS B HUMANOS PRIMARIOS

Se aislaron CMSP humanas de sangre completa usando columnas Accuspin (Sigma). Las CMSP se resuspendieron entonces en tampón BD Stain (Becton Dickinson) a 20 millones de células/ml. Se añadió un µg de anticuerpo monoclonal anti-CXCR5 humano de ratón a 50 µl de CMSP y se dejó que se uniera durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón BD Stain. Se añadieron cincuenta µl del segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE F<sub>(ab)</sub>' (Beckman Coulter) diluido 1/100, a la mezcla de CMSP-anticuerpo y se dejó que se uniera durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón BD Stain. A las células se añadió una mezcla que contenía anti-CD20 humano-FITC de ratón (BD) y CD4-APC (BD) a dilución 1/50, que luego se incubaron durante 20 minutos a 4 °C para evaluar la especificidad por linfocitos B/T. Las células se lavaron 3 veces con tampón BD Stain y se resuspendieron en 250 µl de tampón BD Stain y se sometieron a análisis de FACS en un FACStar Plus, se usa anticuerpo de ratón anti-CXCR5 humano (R&D; mAb190) como control positivo. Se generaron curvas de valoración para anticuerpos humanizados y se representó la intensidad media de fluorescencia (MFI) frente a la concentración.

Los anticuerpos humanizados del Ejemplo 7 se probaron para unirse a CMSP humanas.

Los anticuerpos, aparte de CA13 de control negativo, se unen y tienen el mismo perfil de valoración en linfocitos B humanos. CA13 de control negativo demostró solo unión de fondo. El clon de BD RF8B2 se une poco a CMSP humanas.

#### EJEMPLO 10: ENSAYO DE REACTIVIDAD DE LINFOCITOS B DE CINOMOLGO

Se obtuvo sangre completa de mono cinomolgo (cino) de Bioreclamation, Inc. (Hicksville, NY). La sangre se transportó en tubos de preparación de BD Cell (CPT) después de la centrifugación. Las CMSP de cino contenidas en la capa de plasma se extrajeron del tubo de CPT en un tubo de 50 ml dejando la capa de gel en gradiente sin tocar. El tubo se lavó con 5 ml de PBS para extraer completamente todas las células y el lavado se añadió a un tubo de 50 ml nuevo. Se centrifugaron las CMSP de cino a 1200 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón BD FACS Stain (BD). Se usaron un millón de células por ensayo. Se añadió un µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR5 humano (purificado) a 50 µl de CMSP y se dejó que se uniera durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron 2 veces con tampón BD Stain. Se añadieron cincuenta µl del segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE F<sub>(ab)</sub>' (Beckman Coulter) diluido 1/100 a las células y se dejó que se uniera durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón BD Stain. A las células se añadió una mezcla que contenía anti-CD20 humano-FITC de ratón (BD) y CD4-APC (BD) a dilución 1/20 durante una incubación de 20 minutos a 4 °C para la evaluación de la especificidad por linfocitos B/ T. Las células se lavaron 3 veces con tampón BD Stain, y se resuspendieron en 250 µl de tampón BD Stain y se sometieron a análisis de FACS en un FACStarPlus. Se usó mAb de ratón anti-CXCR5 humano comercial (R&D; MAB190) como control positivo.

Se compararon 11D6 monoclonal de ratón de la presente invención reactivo con CXCR5 humano con un control de isotipo de IgG. Las versiones humanizadas de 16D7 y el MAB190 comercialmente disponible se probaron para reactividad con CXCR5 de cinomolgo. También se probó 79B7.

Se encontraron células positivas para CD20 y CXCR5 con MAB190 y 11D6. Por otra parte, 16D7 y las variantes humanizadas de los mismos, además de G7 y BD RF8B2 y 2C1 de Abnova, no se unieron a linfocitos B de cinomolgo. 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 también se unieron a linfocitos B de cinomolgo.

Se usaron los presentes anticuerpos contra CXCR5 para estudiar células de sangre periférica. Los linfocitos B expresaron CXCR5 y en al menos un experimento se encontró que aproximadamente el 10 % de los linfocitos T expresaban CXCR5.

#### EJEMPLO 11: SECUENCIACIÓN DE mAb ANTI-CXCR5

Se isotipificaron los anticuerpos monoclonales de ratón usando un kit de isotipificado comercialmente disponible. Se secuenciaron las secuencias variables de 16D7 y otros mAb anti-CXCR5. Se aisló ARN total de aproximadamente 5 millones de células del hibridoma usando el kit Qiagen Qianeasy miniprep siguiendo el protocolo del kit. Se sintetizó ADNc de primera cadena usando el kit Superscript de Invitrogen (Cat 11904-018), se siguieron los protocolos del kit.

Se amplificaron primero las regiones de las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera usando los siguientes cebadores de PCR degenerados y Taq polimerasa (Roche) basándose en los métodos descritos en Wang et al. J Immunol Methods. 233:167-77, 2000.

Cadena pesada: Cebador izquierdo:

1: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO: 2)

2: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO: 3)

Cadena pesada: Cebador derecho:

GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEQ ID NO: 4)

5 Cadena ligera: Cebador izquierdo:

GGAGCTCAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO: 5)

Cadena ligera: Cebador derecho:

TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO: 6)

10 donde R es o bien A o bien G; N es o bien A, G, T o bien C; M es o bien A o bien C; W es o bien A o bien T; S es G o C; y Y es C o T.

Los productos de PCR se clonaron en pCR4-TOPO® usando el kit TOPO TA cloning® de Invitrogen (Cat N.º: 45-0641) y se secuenciaron usando los cebadores T3 y T7. Las secuencias se sometieron entonces a Blast contra la base de datos GenBank para deducir las secuencias conductoras para la clonación de regiones variables completas. Basándose en los resultados de blast, se eligieron los siguientes cebadores (Chardes et al., FEBS Letters 452:386-394, 1999) para una segunda ronda de amplificación por PCR usando Pfx polimerasa (Invitrogen).

Cadena pesada:

Cebador izquierdo:

CCAAGCTGTGCCTRTCC (SEQ ID NO: 7)

Cebador derecho:

20 CGACAAGTCGACTAGCCCTTGACCAGGCATCC (SEQ ID NO: 8)

Cadena ligera:

Cebador izquierdo:

WTCTCTRGACTIONACTGCG (SEQ ID NO: 9)

Cebador derecho:

25 CGACTAGTCGACTGGTGGGAAGATGGATACAG (SEQ ID NO: 10)

Se clonaron los productos de PCR en pCR-Blunt II®-TOPO® usando el kit de clonación por PCR de Invitrogen Zero Blunt® TOPO® (Cat 45-0245) y se secuenciaron usando los cebadores T7.

Una vez se secuencian las cadenas ligeras y pesadas, pueden registrarse los ácidos nucleicos para optimizar la expresión en, por ejemplo, células hospedadoras humanas.

### 30 EJEMPLO 12: TRANSFECTOMAS

Se cultivan células NS0-eu a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se mantienen en fase de crecimiento exponencial y el medio se cambia el día antes de la transfección. El día de la transfección, se lavan  $40 \times 10^6$  células. Entonces, se añaden 10 µg de ácido nucleico linealizado, tal como ADN de cadena ligera, y 10 µg de, por ejemplo, ADN de cadena pesada linealizado, a la suspensión de células (el volumen de ADN total debe ser inferior a 50 µl y el cultivo incubarse sobre hielo durante 15 min. La mezcla ADN y células se transfiere a una cubeta enfriada (0,4 cm) y se aplica un pulso eléctrico (750 V y 25 µF). La cubeta se dispone sobre hielo inmediatamente después del pulso eléctrico y se mantiene sobre hielo durante 10-15 min. Las células se recogen y se siembran. Las células se incuban en una de estufa de incubación con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 12-16 días o hasta que aparezcan las colonias. El sobrenadante de las colonias de células o células cultivadas en cultivo en suspensión se prueba por ELISA y se clonan transfectomas positivos en medio fresco. Para cribar adicionalmente los transfectomas positivos, se realiza o bien ELISA de valoración o el ensayo Biacore. Los transfectomas expandidos se mantienen en matraces agitadores y el anticuerpo o derivado del mismo se recoge del sobrenadante.

### 40 EJEMPLO 13: ENSAYOS *IN VIVO*

45 Se ha usado la artritis inducida por colágeno (CIA), un modelo bien establecido para AR humana, para demostrar la eficacia de anticuerpos contra TNFα (Williams et al., PNAS 1992, 89:9784-9788), además de proteínas de fusión de

CTLA-4 y TNF $\alpha$  (Webb et al., Eur J Immunol. 1996, 26:2320-2328; y Wooley et al., J Immunol. 1993, 151:6602-6607). Se perfiló un anticuerpo monoclonal de rata anti-CXCR5 de ratón, clon 1038, en un modelo de ratón de CIA en el que ratones DBA/IJ se inmunizaron y reforzaron con un colágeno de pollo de tipo II. Se monitorizó la gravedad de la enfermedad (que se puntuó visualmente midiendo la hinchazón/inflamación de la pata) dos veces a la semana, mientras que las articulaciones recogidas al final del estudio se evaluaron para cambios en la inflamación, paño, destrucción de cartilago y erosión de hueso. El clon 1038, cuando se administra en una pauta posológica profiláctica, redujo significativamente tanto la gravedad de la enfermedad como la patología de la articulación en comparación con ratones con CIA tratados con isotipo (ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ).

Se empleó un modelo agudo de ratón para evaluar la eficacia de 16D7-HC1-LC3 en la quimiotaxis *in vivo*. Brevemente, se generaron ratones C57/B16 (8-16 semanas de edad) que expresaban selectivamente huCXCR5 en linfocitos B, linfocitos T y neutrófilos, por métodos transgénicos tradicionales usando un promotor CD11a. El modelo de la quimiotaxis *in vivo* es un modelo conducido por neutrófilos. Tras la administración intraperitoneal de 20  $\mu$ g de ligando huCXCL13 (R&D), neutrófilos de ratón que expresaban el receptor huCXCR5 migraron a la cavidad peritoneal en respuesta a un gradiente de huCXCL13. Se usaron lavados de la cavidad peritoneal para recuperar las células 80 minutos después de la administración intraperitoneal de huCXCL13 y se usó análisis fluorocitométrico para cuantificar el número de neutrófilos que expresaban huCXCR5 en muestras de 2 ml de lavados peritoneales que migraron específicamente en la cavidad peritoneal en respuesta a instilación de huCXCL13. Se identificaron neutrófilos por marcadores fenotípicos, tales como Ly6G, CD19 y CD11b. La administración subcutánea de anti-hCXCR5 humanizado, 16D7-HC1LC3, a dos dosis diferentes (7,5  $\mu$ g o 15  $\mu$ g) 24 horas antes de la instilación de huCXCL13 mostró eficacia en reducir la migración de neutrófilos que expresaban huCXCR5 a la cavidad peritoneal en respuesta a huCXCL13 cuando se compara con un control tratado con isotipo, demostrando las dos muestras tratadas con anticuerpo contra CXCR5 niveles esencialmente no estadísticamente diferentes de neutrófilos en comparación con el nivel de control negativo de isotipo de neutrófilos. A 1,5  $\mu$ g, el anticuerpo contra CXCR5 humanizado mostró un bajo nivel de inhibición de la migración de neutrófilos en comparación con la dosis más alta de anticuerpo contra CXCR5 probado.

#### EjemPlo 14: ACONDICIONAMIENTO SUPERFICIAL

El acondicionamiento superficial del clon 16D7 murino siguió las etapas descritas en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:969 y en la patente de EE.UU. N.º 5.639.641.

Se sometieron a blast las secuencias V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de 16D7 frente a Protein Data Bank (Nucleic Acids Research, 28:235-242 (2000) o puede accederse a Protein Data Bank (PDB) en internet, que contiene las coordenadas 3D de macromoléculas biológicas, y se recuperaron las diez secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada más similares a las de 16D7. Los códigos de identificación de PDB se usan para identificar las secuencias.

Los diez homólogos más próximos para la cadena ligera variable fueron 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), 1AE6 (Proteins 29:161-171, 1997), 1QYG (Pozharski et al., "Carving a Binding Site: Structural Study of an Anti-Cocaine Antibody" en "Complex with Three Cocaine Analogs"), 1UZG (J Virol 79:1223, 2005), 1UB5 (Beuscher et al., "Structure and Dynamics of Blue Fluorescent Antibody 19G2 at Blue and Violet Fluorescent Temperatures"), 1RUR (Proc Natl Acad Sci USA 110:2247-2252, 2004), 1FPT (Nat Struct Biol 2:232-243, 1995), 1QFU (Nat Struct Biol 6:530-534, 1999), 1NAK (Virology 315:159-173, 2003) y 1CGS (J Mol Biol 236:247-274, 1994) (se eliminaron las secuencias redundantes) y los diez homólogos más próximos para la cadena pesada variable son 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000), 1OAK (Nat Struct Biol 5:189-194, 1998), 1VFB (Proc Natl Acad Sci 91:1089-1093, 1994), 1CIC Nature 348:254-257, 1990), 1GIG (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50:768-777, 1994), 1T4K (J Mol Biol 343:1269-1280, 2004), 1A7P (Marks et al.), 1FE8 (J Biol Chem 276:9985-9991, 2001), 1DL7 (J Exp Med 191:2101-2112, 2000) y 1YY8 (Cancer Cell 7:301-311, 2005). Los homólogos más próximos para la cadena ligera y pesada fueron 1MJU y 1FNS, respectivamente. Se usaron aquellas dos secuencias para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se minimizó en energía por una minimización en gradiente del conjugado de posiciones de coordenadas atómicas con el campo de fuerza CHARMM22 (J Comput Chem (1983) 4, 187; J Comput Chem (1986) 7, 591) como se implementó en el paquete MOE (Chemical Computing Group, Quebec, CA). El modelo se usó para localizar las regiones CDR y los restos de la región estructural. Se calculó la accesibilidad del disolvente para cada resto de la región variable de los diez homólogos más próximos para cada región variable del anticuerpo y se promedió en una hoja de cálculo de Excel como se implementó en un protocolo de SciTegic (Hill & Lewicki (2006) Statistics: Methods and Applications, Statsoft, Tulsa, OK). Posiciones con más del 30 % de accesibilidad promedio se consideraron restos de superficie. Se consideraron además las posiciones con accesibilidades promedio de entre el 25 % y el 30 % dependiendo de la proximidad a los bucles de CDR.

Se compararon las posiciones de superficie de la región variable de 16D7 murina con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpo humano. Solo se retuvieron para la búsqueda aquellos restos que presentaron un área superficial accesible superior al 30 %, presentando algunos restos un área superficial accesible superior al 25 % y que estuvieron flanqueando restos expuestos a disolvente. Se incluyeron algunos restos conservados en todas las secuencias de inmunoglobulina para mejorar la convergencia de la búsqueda. Solo se retuvieron las secuencias de la línea germinal para el análisis de los resultados positivos. Se eligió la superficie de la región variable de anticuerpo humano con los restos superficiales más idénticos, dando especial consideración a las

posiciones que entran dentro de 5,0 Å de una CDR, para sustituir los restos superficiales de la región variable del anticuerpo 16D7 murino.

Ninguna de las secuencias contiene ningún epítoto de linfocito B o linfocito T conocido enumerado en Immune Epitope Database (IEDB, Immune Epitope Database y página web de Analysis Resource; PLoS Biol. 2005;3(3):e91).

5 Las secuencias originales de dominios variables de 16D7 murinos son:

la cadena ligera (las CDR están subrayadas):

DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLHSSGKTYLY  
WFLQRPQGSPQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV  
YYCMQHLEYP YTFGGGKLE IK (SEQ ID NO:11);y

la cadena pesada (las CDR están subrayadas)

QVQLKESGPGGLVAPSQSLITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
PGKGLEWLGVIWGDGTTYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFL  
KMNSLQTDDETAMYYCARIVYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:12).

10 El conjunto retenido de restos de superficie para la búsqueda de la cadena ligera incluyeron D1, V3, A7, P9, P15, R16, E17, S18, P45, G46, Q47, D65, R79, R82, E86, K108, E110 y K112.

15 La búsqueda de la cadena ligera contiene el conjunto de restos de superficie definido anteriormente y los aminoácidos conservados, C23, W40, Q43, Y91, C93, F103, G104, G106 y T107, que se incluyeron para la convergencia del protocolo de BLAST. Todos los otros aminoácidos podrían ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. La búsqueda de BLAST se hizo frente a la base de datos de secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana compilada por IMGT (página web de International Immunogenetics Information Systems, Molec Immunol, 2004, 40:647-659). Se encontró que la mejor correspondencia de puntuación era X72482 (proteína\_id=CAA51150.1), de la que se derivó la cadena ligera, LC4. LC5 y LC6 son dos variantes de VL4 (VL significa ligera variable) que se sugiere que tratan posibles restos problemáticos en la cadena ligera: 1 metionina expuesta (M51) para mutarse a Leu (LC5 y LC6) y 1 posible sitio de sitio desamidación (LC6) donde la asparagina N53 se cambia a un resto de serina. En total, se proponen 3 versiones para la cadena ligera variable que contienen entre 4 y 6 mutaciones cuando se compara con el clon 16D7 murino parental. Las mutaciones correspondientes se dan en la siguiente Tabla 1. Se dan numeración secuencial y de Kabat.

25 El conjunto retenido de restos superficiales para la cadena pesada variable incluyó Q1, Q3, K5, S7, P9, L11, S15, Q16, S20, P41, G42, K43, S61, A62, K64, S65, R70, S74, Q75, Q86, T87, D88, Q103, L106, A111, A112 y K113 (numeración secuencial). Los aminoácidos invariantes que se incluyeron en la búsqueda de BLAST para la convergencia de la búsqueda fueron: C22, W36, I37, Q39, D89, Y93, C95, W101, G102, G104 y T105. La búsqueda de BLAST se hizo frente a la base de datos de secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana compilada por IMGT. Se retuvo una versión para la cadena pesada (HC3). Los dos dominios V<sub>H</sub> de AF062266 (proteína\_id=AAC18304.1) y AY393082 (proteína\_id=AAS86018.1), que mostraron la mejor puntuación de ajuste para el conjunto de restos de superficie, presentan puntuación de similitud equivalente y muestran restos de superficie idénticos. Por consiguiente, solo una única secuencia para la cadena pesada fue retenida con diez mutaciones. Las secuencias de puntuación más bajas que tienen diferentes restos de superficie no fueron retenidas, ya que tienen menos restos polares, que sugiere posible solubilidad reducida.

TABLA 1

Cadena ligera (numeración secuencial)	Cadena ligera (numeración de Kabat)	Versión 5 (LC4)	Versión 6 (LC5)	Versión 7 (LC6)
Ala7	Ala	Ser	Ser	Ser
Pro9	Pro	Leu	Leu	Leu
Arg1	Arg	Gly	Gly	Gly
Met5	Met	Met	Leu	Leu
Asn5	Asn	Asn	Asn	Ser
Arg8	Arg	Lys	Lys	Lys
<b>En total para VL</b>		<b>4 mutaciones</b>	<b>5 mutaciones</b>	<b>6 mutaciones</b>
Cadena pesada (numeración secuencial)	Cadena pesada (numeración de Kabat)	(HC3)	(HC3)	(HC3)
Lys5	Lys	Gln	Gln	Gln
Gln1	Gln	Glu	Glu	Glu
Ser6	Ser	Pro	Pro	Pro
Ala6	Ala	Ser	Ser	Ser
Arg7	Arg	Ser	Ser	Ser
Gln7	Gln	Lys	Lys	Lys
Gln8	Gln	Thr	Thr	Thr
Thr8	Thr	Ala	Ala	Ala
Asp8	Asp	Ala	Ala	Ala
Ala11	Ala	Ser	Ser	Ser
<b>En total para VH</b>		<b>10 mutaciones</b>	<b>10 mutaciones</b>	<b>10 mutaciones</b>

Se proponen tres versiones para la cadena ligera (LC4, LC5 y LC6). Las mutaciones individuales introducidas a través del acondicionamiento superficial de las cadenas variables se indican en minúsculas y subrayadas y las CDR están subrayadas. Las secuencias acondicionadas superficialmente de las regiones variables se enumeran a continuación, no está incluido el dominio constante (IgG4).

LC4:

DIVMTQ<sub>5</sub>AI<sub>S</sub> VAVTP<sub>g</sub>ESVS ISCRSSKSL<sub>L</sub> HSSGKTYLYW  
 FLQRPQGSPQ LLIYR<sub>MS</sub>NLASGVPDRFSGS GSGTAFTL<sub>k</sub>I SRVEAEDVGV  
 YYCMQHLEYP YTFGGG<sub>T</sub>KLE IK (SEQ ID NO:13)

LC5:

DIVMTQ<sub>5</sub>AI<sub>S</sub> VAVTP<sub>g</sub>ESVS ISCRSSKSL<sub>L</sub> HSSGKTYLYW  
 FLQRPQGSPQ LLIYR<sub>IS</sub>NLASGVPDRFSGS GSGTAFTL<sub>k</sub>I SRVEAEDVGV  
 YYCMQHLEYP YTFGGG<sub>T</sub>KLE IK (SEQ ID NO:14)

LC6:

DIVMTQ<sub>5</sub>AI<sub>S</sub> VAVTP<sub>g</sub>ESVS ISCRSSKSL<sub>L</sub> HSSGKTYLYW  
 FLQRPQGSPQ LLIYR<sub>ISsn</sub>NLASGVPDRFSGS GSGTAFTL<sub>k</sub>I SRVEAEDVGV  
 YYCMQHLEYPYTFGGG<sub>T</sub>KLE IK (SEQ ID NO:15)

Se propuso una versión para la cadena pesada (VH3) (VH significa pesada variable). Las mutaciones introducidas mediante el acondicionamiento superficial de la cadena variable están en minúscula y subrayadas, y las CDR están subrayadas. No está incluida la secuencia del dominio constante.

HC3:

QVQL<sub>g</sub>ESGPG LVAP<sub>Sg</sub>SLSI TCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
 PGKGLEWLGVIWGDGTTY<sub>YN</sub> <sub>ps</sub>LKSRLS<sub>ls</sub> KDNS<sub>k</sub>SQVFL KMNSL<sub>taa</sub>DT  
 AMYYCARIVYWGQGLVTVS <sub>s</sub> (SEQ ID NO:16)

5

Se generaron secuencias de nucleótidos por OE-PCR y se clonaron en sitios NheI/HindIII del vector de expresión episómico pXL4214 (Durocher et al., NAR, 2002, 30(2), E9. Las secuencias están optimizadas en codones para la expresión en células humanas. V<sub>L</sub> se fusionó con IGKC (AAH93097). V<sub>H</sub> se fusionó con IGHG4 (AAH25985), que carece de Lys del extremo C (IGHG4ΔK). Las secuencias se validaron por secuenciación de hebra doble.

10 LC4:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSI<sub>SCRSSK</sub>SLL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGV<sub>PDRFSGSGSGT</sub>AFTLKISR<sub>V</sub>  
 EAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGG<sub>TKLEIKRTVAAPS</sub>VFI<sub>FPPSDEQLKSGTAS</sub>  
 VVCLLN<sub>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS</sub>SSTL<sub>TL</sub>SK  
 ADY<sub>EKHK</sub>VYACEVTHQGLSSPVT<sub>KSFNRGEC</sub> (SEQ ID NO:17)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC  
 CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCGGAGGACGTGGGCGGTGTA<sub>CTACTGCA</sub>  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCGGTTCATCTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT  
 CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:18)

LC5:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSI<sub>SCRSSK</sub>SLL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIY<sub>RLS</sub>NLASGV<sub>PDRFSGSGSGT</sub>AFTLKISR<sub>VE</sub>  
 AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGG<sub>TKLEIKRTVAAPS</sub>VFI<sub>FPPSDEQLKSGTASV</sub>  
 VCLLN<sub>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS</sub>SSTL<sub>TL</sub>SKA  
 DY<sub>EKHK</sub>VYACEVTHQGLSSPVT<sub>KSFNRGEC</sub> (SEQ ID NO:19)

15



GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC  
 CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT  
 CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:20)

LC6:

MGWSCIIIFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVE  
 AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLILSKA  
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC  
 CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT  
 CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:22)

5 HC3:

MGWSCIIIFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVAPSELSITCTVSGFSLID  
 YGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKMN  
 SLTAADTAMYYCARIVYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL  
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  
 KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQ  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:23)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGG  
 CCTGGTGGCCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT  
 TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAG  
 GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA  
 CCCCAGCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCTCCAAGGACAACAGCAAGAGCC  
 AGGTGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGACCGCCGCCGACACCGCCATGTAC  
 TACTGCGCCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAG  
 CAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTGCTCCCG  
 GTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTT  
 CCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGT  
 GCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTC  
 CGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAA  
 CGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCA  
 AGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGGCGGAC  
 CTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCC  
 GGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCT  
 GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAA  
 GACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATCCACCTACCGGGTGGTGTCTG  
 TGCTGACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGT  
 AAGGTCTCAACAAGGGCCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAA  
 GGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCC  
 AGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGC  
 TTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGA  
 GAACAATAACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACG  
 TCTTTTCCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA  
 AGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:24)

### EJEMPLO 15: HUMANIZACIÓN

5 Se sometieron a blast las secuencias de  $V_L$  y  $V_H$  de 16D7 y los homólogos más próximos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con puntuaciones de similitud equivalentes. 1MJU fue retenido como molde debido a la alta exactitud de la estructura cristalina, que había sido determinada a 1,22Å de resolución. Se encontró que el homólogo más próximo para la cadena pesada era 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000). Se usaron las estructuras 1MJU y 1FNS para formar un modelo de homología de los dominios variables que fue posteriormente minimizado en energía usando procedimientos convencionales. Posteriormente se realizó un cálculo de dinámica molecular (MD) de un modelo de homología 3D de 16D7 durante 1,7 nanosegundos en disolvente implícito Generalized Born (véase Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499).

10 La MD empieza por un inicio de las velocidades de una distribución gaussiana a 298,15°K, seguido de un periodo de equilibrio de 300 ps. Durante la MD, todos los enlaces son restringidos usando el algoritmo SHAKE (véase Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), la etapa de tiempo fue 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración de Verlet, se realizó en el conjunto NVT canónico (número de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 298,15°K. Durante el periodo de producción, se almacenaron luego 1.700 instantáneas, una cada 1 ps. Las 1.700 conformaciones del anticuerpo murino constituyen el conjunto en el que se realizó el siguiente análisis para identificar los restos más flexibles. Se usó Scientific Vector Language (SVL), disponible dentro del entorno de modelado molecular MOE (entorno de operación molecular (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canadá) para codificar los siguientes análisis. Primero, cada instantánea, N, se superpuso óptimamente sobre su predecesora, la instantánea N-1, para controlar los movimientos rotacionales y traslacionales globales que se producen durante el modelado de MD y cálculo. La superposición se obtuvo minimizando la distancia media cuadrática (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos instantáneas. Solo los átomos pesados del esqueleto de anticuerpo se consideraron en el ejercicio de superposición. Usando el mismo método de superposición, cada instantánea se superpuso entonces sobre la instantánea medoide. La instantánea medoide es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más parecidas a las coordenadas promedio de todas las conformaciones.

25 Para cada resto del anticuerpo i, se calcularon las RMSD entre los átomos pesados de la conformación j y una conformación de referencia medoide k. La RMSD tiene la siguiente fórmula:

$$RMSD_{j=k} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (d_{ik})^2}{m}}$$

con  $d_{ik}$  definida como la distancia euclídea expresada en Angstroms (Å) entre el átomo pesado 1 del resto  $j$  y su homólogo de la conformación de referencia medoide  $k$ . Para la asociación por parejas de átomos pesados 1, también se consideró la simetría de los átomos pesados de la cadena lateral para los aminoácidos, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr. La conformación de referencia  $k$  varía de un resto a otro, y se corresponde con la conformación medoide  $k$  con la distancia euclídea más próxima a las coordenadas promedio de todas las conformaciones del resto  $i$  estudiado. Entonces, para cada resto  $i$ , se obtuvo una distribución de 1.700 valores de RMSD, que refleja la variación de coordenadas del resto  $i$  en el transcurso de MD. Sumando todos los valores de RMSD de todos los restos del anticuerpo estudiado, se obtuvo una distribución global de todas las RMSD. Entonces se usó la distribución global de todas las RMSD como distribución de referencia. Si el resto  $i$  es altamente flexible, entonces se realizó una prueba estadística para decidir si la RMSD media observada del resto  $i$ ,  $m_i$ , era significativamente superior a la RMSD media global para todos los restos,  $m_g$ . Como la muestra es grande, por ejemplo 1.700 para el análisis del clon 16D7, se usó una prueba de la  $Z$  unilateral (véase Dorofeev & Grant, "Statistics for real-life sample surveys. Non-simple-random samples and weighted data" 2006. Cambridge University Press), siendo la hipótesis nula  $H_0$  que " $m_i$  observado es inferior a  $m_g$  global" para calcular el parámetro estadístico,  $Z_i$  según la fórmula:

$$Z_i = \frac{(m_i - m_{global})}{\sqrt{\frac{sd_i}{n}}}$$

donde  $m_i$  es la RMSD media calculada a partir de la distribución de RMSD del resto  $i$ ,  $m_g$  es la RMSD media calculada a partir de la distribución de RMSD global,  $sd_i$  es la desviación estándar calculada a partir de la distribución de RMSD de resto  $i$  y  $n$  es el tamaño de muestra, es decir,  $n=1.700$  para el análisis del clon 16D7. Entonces se comparó  $Z_i$  calculado con las probabilidades acumuladas de la distribución normal estándar para evaluar un 99,9 % de nivel de significancia de la hipótesis alternativa, es decir, que " $m_i$  observado es superior a  $m_g$  global". Se correspondió con una  $Z_i \geq 3,08$ . El parámetro estadístico  $Z_i$ , que puede visualizarse como una puntuación de flexibilidad, no se correlaciona ni con el peso molecular ni con el número de átomos pesados del resto de anticuerpo ( $r^2=0,014$  y  $0,0009$ , respectivamente cuando se analizan la MD del modelo anti-CXCR5 de 16D7).

El conjunto de restos flexibles para la cadena ligera incluye los siguientes restos (numeración secuencial): D1, T14, P15, R16, E17, Q47, D65, S72, R79, R82, E86, K108, E110 y K112; y para la cadena pesada incluye los siguientes restos; Q1, V2, Q3, L11, S15, Q16, S61, A62, K64, S65, R70, D72, Q75, K81, M82, N83, Q86, Q103, S110, A111, A112 y K113. Las porciones flexibles de 16D7 se compararon con las posiciones correspondientes de secuencias de anticuerpo humano en la versión de septiembre de 2005 de la página web ImMunoGeneTics Database.

Aquellos restos que muestran una puntuación flexible significativamente alta y algunos restos flanqueantes que preservan las estructuras 3D de los restos flexibles fueron retenidos para la búsqueda.

Se eligió la región variable de anticuerpo humano con los restos flexibles más idénticos, dando especial consideración a las posiciones que están dentro de 5,0 Å de una CDR, para sustituir los restos flexibles de la región variable del anticuerpo 16D7 murino. Se sometieron a blast las secuencias humanizadas resultantes para similitud de secuencias en la base de datos UniProtKB/SwissProt proporcionando confianza de que se habían hecho suposiciones razonables. Todas las secuencias mostraron un alto grado de similitud con varios anticuerpos humanos. Además, ninguna de las secuencias contuvo ningún epítoto de linfocitos B o linfocitos T conocido enumerado en la base de datos IEDB.

La mejor correspondencia de secuencia en IEDB para la cadena ligera (LC1, LC2 y LC3) fue KPGQPPRLLIYDASNRATGIPA (SEQ ID NO: 25), que cubre CDR2 pero tiene diferencia de restos significativa como se tipifica por un 56 % de identidad de secuencia obtenida de una búsqueda de BLAST dentro de la base de datos IEDB.

La mejor correspondencia en IEDB para la cadena pesada (HC1 y HC2) fue TDDTAMYYCARI (SEQ ID NO: 26) que se localiza antes del comienzo de CDR3. La secuencia presenta 61 % de identidad de secuencia con el péptido SEDSALYYCARD (SEQ ID NO: 27), haciendo poco probable que sea un posible epítoto de linfocitos T humano (J Exp Med (1995) 181, 1540)

Secuencias originales de dominios variables 16D7 murinos son:

cadena ligera (CDR subrayadas):

ES 2 672 769 T3

DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLHSSGKTYLY  
WFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY  
CMQHLEYPTYTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:28); y

cadena pesada (CDR subrayadas):

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
PGKLEWLGVIWGDGTFYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKMNSLQTD  
DTA MYTCARIVYWGQGLVTVS A (SEQ ID NO:29).

- 5 Se sugirieron dos versiones para la cadena pesada (HC1 y HC2) y tres versiones para la cadena ligera (LC1, LC2 y LC3). Ambas versiones de la cadena pesada derivan de AF262096/AAF79987 y AB063657/BAC01285.1, respectivamente. Las dos secuencias presentan puntuación de similitud equivalente, pero se mantuvieron debido a que los conjuntos de restos a mutar parecían parecer relativamente diferentes y mostraban diferentes propiedades fisicoquímicas. La secuencia de LC1 deriva de BAC01682/AB064054.1 y solo hay dos restos a mutar. LC2 y LC3 son variantes de LC1 que se sugiere que tratan posibles restos problemáticos en la cadena ligera: una metionina expuesta (M51) mutada a Leu (versiones 3 y 4) y un posible sitio de desamidación (versión 4) donde la asparagina, N53, se cambia a un resto de serina. No todas las combinaciones fueron retenidas, pero cuatro cubren la mayoría de los puntos clave a ser tratados. Se usa la numeración de Kabat.
- 10

Tabla 2

Cadena ligera (numeración secuencial)	Cadena ligera (numeración de Kabat)	Versión 1 (LC1)	Versión 2 (LC1)	Versión 3 (LC2)	Versión 4 (LC3)
g16	Ar 6	Arg1	ly G	ly G	ly G
u17	G1 7	Glu1	la A	la A	la A
t56	Me 1	Met5	et M	et M	eu L
n58	As 3	Asn5	sn A	sn A	er S
En total para VL		2 mutaciones	2 mutaciones	3 mutaciones	4 mutaciones
Cadena pesada	Cadena pesada	(HC1)	(HC2)	(HC1)	(HC1)
n1	G1	Gln1	ln G	lu G	ln G
r15	Se 5	Ser1	er S	ly G	er S
n16	G1 6	Gln1	ln G	ly G	lu G
r61	Se 1	Ser6	ro P	la A	ro P
a62	Al 2	Ala6	er S	ro P	er S
r65	Se 5	Ser6	er S	ly G	er S
g70	Ar 0	Arg7	er S	er S	er S
n75	G1 5	Gln7	ys L	ys L	ys L
s81	Ly 1	Lys8	ys L	ln G	ys L
t82	Me 2	Met8	al V	et M	al V
n83	As 2A	Asn8	hr T	sn A	hr T
n86	G1 3	Gln8	hr T	ys L	hr T
a111	Al 13	Ala1	la A	er S	la A
En total para VH		8 mutaciones	11 mutaciones	8 mutaciones	3 mutaciones

Las mutaciones introducidas mediante la humanización de las cadenas variables están en minúscula y subrayadas y las CDR están subrayadas. No están incluidos los dominios constantes.

5 LC1:

DIVMTQAAPSVAVTP<sup>ga</sup>SVSISCRSSKSL LHSSGKTYLYW  
 FLQRPQGSPQLLIYRMSN<sup>la</sup>SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV  
 YYCMQHLEYPYTFGGGKLE IK (SEQ ID NO:30)

LC2:

DIVMTQAAPSVAVTP<sup>ga</sup>SVS ISCRSSKSL LHSSGKTYLYW  
 FLQRPQGSPQLLIYRISN<sup>la</sup>SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV  
 YYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:31)

LC3:

DIVMTQAAPSVAVTP<sup>ga</sup>SVSISCRSSKSLHSSGKTYLYW  
FLQRPQSPQLLIYRIS<sup>s</sup>LASGV<sup>p</sup>DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV  
YYC<sup>mo</sup>HLEY<sup>py</sup>TFGGG<sup>t</sup>KLEIK (SEQ ID NO:32)

HC1:

QVQLKESGPGLVAP<sup>se</sup>SLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
PGKGLEWL<sup>gviw</sup>GDG<sup>tty</sup>YN<sup>ps</sup>LK<sup>r</sup>SL<sup>s</sup>SK<sup>d</sup>NS<sup>k</sup>SQ<sup>v</sup>FL<sup>k</sup>vt<sup>sl</sup>t<sup>dd</sup>T  
AMYYCARIVYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:33)

HC2:

<sup>e</sup>VQLKESGPGLVAP<sup>gg</sup>SLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
PGKGLEWL<sup>gviw</sup>GDG<sup>tty</sup>YN<sup>ap</sup>L<sup>k</sup><sup>g</sup>R<sup>l</sup><sup>s</sup><sup>k</sup>D<sup>n</sup><sup>s</sup><sup>k</sup>SQ<sup>v</sup>FL<sup>g</sup>M<sup>n</sup><sup>s</sup><sup>l</sup><sup>k</sup>T<sup>dd</sup>T  
AMYYCARIVYWGQGLVTVS<sup>s</sup> (SEQ ID NO:34)

5

Las secuencias de las construcciones químicas son como siguen:

Secuencia de LC química

MGWSCIIIFLVATAATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPRESVSI<sup>s</sup>CRSSKSLHSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGV<sup>p</sup>DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC<sup>mo</sup>HLEY<sup>py</sup>TFGGG<sup>t</sup>KLEIKRIVAAPS<sup>v</sup>FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<sup>n</sup>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCA  
CCGCCACCGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGC  
GTGGCCGTGACCCCCGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC  
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTAC  
CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCGGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGEGGCGGCACCAAGCTGGAG  
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCGGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC  
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCT  
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
CCGGCAACTCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
TACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
AAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
CAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGTGAAGCTT (SEQ ID NO:36)

10 Secuencia de HC química

MGWSCIIIFLVATAATGVHSQVQLKESGPGLVAP<sup>s</sup>SLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQPPGKGLEWL<sup>gviw</sup>GDG<sup>tty</sup>YNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKMNSLQTD<sup>dd</sup>TAMYYCARIVYWGQGLVTVSAASTKGPSVFP<sup>l</sup>APCSRSTSESTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFP<sup>l</sup>AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD<sup>ed</sup>PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI<sup>s</sup>KAKGQPREPQVYTLPSQEE<sup>m</sup>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<sup>t</sup>TPPVLDS<sup>d</sup>GSFFLYSRLTVDKSRWQEGN<sup>v</sup>FS<sup>c</sup>SVMIIEALINII<sup>y</sup>TQKSL<sup>s</sup>LSL<sup>g</sup> (SEQ ID NO:37)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCGG  
 CCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT  
 TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAG  
 GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA  
 CAGCGCCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCCGCAAGGACAACAGCCAGAGC  
 CAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATGTA  
 CTAAGTGGCCCCGATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGA  
 GCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCC  
 GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC  
 TTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC  
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTAAGTCCCTGTCC  
 TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT  
 AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT  
 CCAAGTACGGCCCTCCTTGGCCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGGGC  
 GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCT  
 CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGAC  
 CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC  
 CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAAATCCACCTACCGGGTGGTGT  
 CTGTGCTGACCGTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAG  
 TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC  
 CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCCTGCCTCCTA  
 GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG  
 GGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC  
 TGAGAACAACACTACAAGACCAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT  
 TCTTCCCTGTAAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC  
 AACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC  
 CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:38)

Secuencias de VL humanizadas

LC1:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSFTAFTLRISR  
 EAEDVGVVYCMQHLEYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
 VVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSK  
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:39)

5

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCCGAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTAC  
 CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCGGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTATCTTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCT  
 CTACCCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCCTCAACCGGGGCGAGTGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:40)

LC2:

MGWSCIIIFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE  
 AEDVGVYYCMQHLEYPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLKA  
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTAC  
 CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCGGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCT  
 CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCGGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:42)

LC3:

MGWSCIIIFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSL  
 HSSGKTYLYWFLQRPQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE  
 AEDVGVYYCMQHLEYPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLKA  
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGC  
 GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA  
 GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC  
 GCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCC  
 AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTAC  
 CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCGGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA  
 TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC  
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCT  
 CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT  
 CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC  
 TACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCGGACTACGAGAAGCAC  
 AAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC  
 CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:44)

5

Secuencias de VH humanizadas

HC1:

MGWSCIIIFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSESLITCTVSGFSLID  
 YGVNWIROPQPKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKVT  
 SLTTDDTAMYYCARIYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL  
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT  
 KTYTCNVVDHDKPSNTKVDKRVESKYGPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVVDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:45)



GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCGG  
 CCTGGTGGCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT  
 TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAG  
 GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACTACTACAA  
 CCCCAGCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGC  
 CAGGTGTTCCCTGAAGGTGACCAGCCTGACCACCGACGACACCGCCATGTA  
 CACTGCGCCCCGATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGA  
 GCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCC  
 GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCC'TGGTGAAGGACTAC  
 TTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCTGGCGCCCTGACCTCCGGC  
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTA'CTCCCTGTCC  
 TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT  
 AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT  
 CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGGCG  
 GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCT  
 CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC  
 CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC  
 CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAAATCCACCTACCGGGTGGTGT  
 CTGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAG  
 TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTC  
 CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCCTGCCTCCTA  
 GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG  
 GGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC  
 TGAGAACA'ACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT  
 TCTTCCCTGTA'CTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC  
 AACGTCTTTTCCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC  
 CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:46)

HC2:

MGWSCIIIFLVATAATGVHSEVQLKESGPGLVAPGGSLITCTVSGFSLI  
 DYGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNAPLKGRLSISKDNSKSQVFLQ  
 MNSLKIDDDTAMYYCARIVYWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST  
 AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS  
 LGTKTYT'CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP'EFLLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDV'SQEDPEVQFNWYVDGVEVHINAKTKPREEQFNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSQ'EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
 FLYSRLIVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID  
 NO:47)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCA  
 CCGCCACCGGCGTGACAGCGAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCGG  
 CCTGGTGGCCCCGGCGGACGCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT  
 TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAG  
 GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACTACTACAA  
 CGCCCCCTGAAGGGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGC  
 CAGGTGTTCCCTGCAGATGAACAGCCTGAAGACCGACGACACCGCCATGTA  
 CACTGCGCCCCGATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGA  
 GCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCC  
 GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCC'TGGTGAAGGACTAC  
 TTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCTGGCGCCCTGACCTCCGGC  
 GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTA'CTCCCTGTCC  
 TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT

AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT  
 CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCCCTGGGCG  
 GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCT  
 CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC  
 CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC  
 CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGT  
 CTGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG  
 TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCATCGAGAAAACCATCTC  
 CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCCTGCCTCCTA  
 GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG  
 GGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC  
 TGAGAACAATAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT  
 TCTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC  
 AACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC  
 CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:48)

#### EJEMPLO 16: HUMANIZACIÓN BASADA EN TRAYECTORIAS DE DINÁMICA MOLECULAR

- 5 Se sometieron a blast las secuencias  $V_L$  y  $V_H$  de 16D7 en Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28 :235-242) y los homólogos más próximos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con puntuaciones de similitud equivalentes. Se retuvo 1MJU como molde debido a la alta exactitud de la estructura cristalina, que había sido determinada hasta 1,22 Å de resolución. Se encontró que el homólogo más próximo para la cadena pesada era 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884,2000). Se usaron las estructuras 1MJU y 1FNS para construir un modelo de homología de los dominios variables que fue posteriormente minimizado en energía usando procedimientos convencionales.
- 10 Se realizó posteriormente una simulación de dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D de 16D7 durante 1,1 nanosegundos (ns) en disolvente implícito Generalized Born (véase Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499). La simulación de MD empieza por un inicio de las velocidades de una distribución gaussiana a 500K, seguido de un periodo de equilibrado de 200 picosegundos (ps). Durante la simulación de MD, todos los enlaces son restringidos usando el algoritmo SHAKE (véase Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), la etapa de tiempo fue 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración de Verlet, se realizó en el conjunto NVT canónico (número de partícula, volumen y temperatura) a una temperatura de 500K. Esta simulación se hace con limitaciones armónicas aplicadas a los átomos del esqueleto. Se extraen diez conformaciones diversas, una cada 100 ps, durante el último 1 ns de esta primera simulación.
- 15 Estas 10 diversas conformaciones se usan entonces como 10 puntos de partida diversos para realizar 10 simulaciones de dinámica molecular, sin restricciones en el esqueleto, a una temperatura de 300K durante 2,3 ns en disolvente implícito Generalized Born. Cada simulación de MD empieza por un inicio de las velocidades a partir de una distribución gaussiana a 298,15K, seguido de un periodo de equilibrio de 300 ps. Todos los enlaces son restringidos usando el algoritmo SHAKE (véase Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), la etapa de tiempo fue 1 fs, y la simulación, basada en el algoritmo de integración de Verlet, se realizó en el conjunto NVT canónico (número de partícula, volumen y temperatura) a una temperatura de 298,15K. Durante el periodo de producción, se almacenaron entonces 2.000 instantáneas, una cada 1 ps. Se usó Scientific Vector Language (SVL), disponible dentro del entorno de modelado molecular MOE (entorno de operación molecular (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canadá) para codificar el siguiente protocolo posterior al tratamiento.
- 20 Primero, cada instantánea, N, se superpuso óptimamente sobre su predecesora, la instantánea N-1, para desechar los movimientos rotacionales y traslacionales globales que se producen durante el modelado de MD y cálculo. La superposición se obtuvo minimizando la distancia media cuadrática (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos instantáneas. Solo los átomos pesados del esqueleto de anticuerpo se consideraron en la operación de superposición. Usando el mismo método de superposición, cada instantánea se superpuso entonces sobre la instantánea medoide. La instantánea medoide es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más parecidas a las coordenadas promedio de todas las conformaciones. Para cada una de las 10 simulaciones de MD, se usan las últimas 2.000 conformaciones para cuantificar, para cada aminoácido del anticuerpo murino, la desviación de las posiciones atómicas con respecto a una conformación medoide del aminoácido. Para cada resto de anticuerpo i, se calcularon la RMSD entre los átomos pesados de la conformación j y una conformación de referencia medoide k. La RMSD tiene la siguiente fórmula:
- 30
- 35

$$RMSD_j = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (d_{jk})^2}{m}}$$

40

con  $d_{ik}$  definida como la distancia euclídea expresada en Angstroms (Å) entre el átomo pesado 1 del resto  $j$  y su homólogo de la conformación de referencia medoide  $k$ . Para la asociación por parejas de átomos pesados 1, también se consideró la simetría de los átomos pesados de la cadena lateral para los aminoácidos, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr. La conformación de referencia  $k$  varía de un resto a otro, y se corresponde con la conformación medoide  $k$  con la distancia euclídea más próxima a las coordenadas promedio de todas las conformaciones del resto  $i$  estudiado.

Las mutaciones humanizantes se encuentran determinando qué línea germinal de anticuerpo humano es la más similar al anticuerpo murino en términos de sus aminoácidos más flexibles. Para hacer esto, se comparan los movimientos de los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo murino, durante los 20 ns (10 x 2 ns) de simulación de dinámica molecular, con los movimientos de los aminoácidos correspondientes de 49 modelos de homología de líneas germinales de anticuerpo humano, para cada uno de los cuales se han ejecutado 10 simulaciones de dinámica molecular usando el mismo protocolo. Se construyeron 49 modelos de homología 3D de líneas germinales de anticuerpo humano combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras más frecuentes ( $\nu k1, \nu k2, \nu k3, \nu k4, \nu \lambda 1, \nu \lambda 2, \nu \lambda 3$ ) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes ( $\nu h1a, \nu h1b, \nu h2, \nu h3, \nu h4, \nu h5, \nu h6$ ) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, edición de base de datos D593-D597).

Los 60 aminoácidos más flexibles excluyen cualquier aminoácido en la CDR, y su vecindad inmediata, es decir, aminoácido con un carbono  $\alpha$  a una distancia inferior a 5 Å a cualquier carbono  $\alpha$  de los aminoácidos de CDR como se observa en el modelo de homología 3D.

La flexibilidad se cuantifica comparando la RMSD ( $F_i$ ) de un aminoácido dado ( $i$ ) con su conformación medoide como se define previamente, promediada durante 10 simulaciones de dinámica molecular, con la RMSD ( $F_m$ ) de todos los aminoácidos del anticuerpo murino, promediada durante las mismas 10 simulaciones de dinámica molecular. Un aminoácido se considera lo suficientemente flexible para posiblemente interactuar con los receptores de linfocitos T, y desencadenar una respuesta inmunitaria, si la puntuación de flexibilidad  $Z_i$ , definida como  $Z_i = (F_i - F_m)/F_m$ , es superior a 0,15.

Usando este protocolo de estimación de la flexibilidad promediada de dinámica molecular, se han considerado 23 aminoácidos como flexibles en la región variable del anticuerpo 16D7 murino, excluyendo la región CDR y su vecindad inmediata de la misma.

El conjunto de restos flexibles para la cadena ligera incluye los siguientes restos (numeración secuencial): R16, E17, R44, G46, Q47, S48, R79, R82, E84, E86 y E110; y para la cadena pesada incluyen los siguientes restos: K5, P41, G42, K43, K64, R70, D72, N73, S74, Q75, Q86 y Q103.

Se cuantifica la similitud cuatridimensional del anticuerpo murino con los 49 modelos de homología de la línea germinal humana muestreando las posiciones de átomos específicos de los 60 aminoácidos flexibles, usando todas las instantáneas de picosegundos de las 10 simulaciones de dinámica molecular, por medio de una única rejilla cúbica tridimensional. Esta rejilla tiene una resolución de 1 Å. La rejilla tridimensional está hecha de 445740 puntos y ha sido iniciada usando la estructura tridimensional de un modelo cristalográfico de anticuerpo humano basado en el anticuerpo, 8FAB (Biochem 30:3739-3748, 1991). El modelo de 8FAB también se usa para posicionar todas las conformaciones de instantáneas de picosegundos de un anticuerpo que se muestrea en la rejilla tridimensional. Para este fin, la conformación medoide de la dinámica molecular del anticuerpo se superpone sobre el modelo de 8FAB. Esta superposición consiste en alinear los momentos de inercia de los 2 modelos, seguido de la minimización de las distancias escalares entre los carbonos  $\alpha$  de ambos modelos. Todas las conformaciones restantes de la simulación de dinámica molecular se superponen sobre la conformación medoide usando el mismo método.

Se hacen dos tipos de muestreo que producen dos similitudes (similitud electrostática y similitud lipófila), para un par de anticuerpos que se comparan. Estas dos similitudes se añaden entonces para obtener la similitud total. El muestreo electrostático considera todos los átomos de la cadena lateral del aminoácido. El valor en un punto,  $x$ , de la rejilla se obtiene aplicando una función gaussiana tridimensional  $f(x)$  ponderada con la carga parcial atómica como se describe en el campo de fuerza Amber99 (Cieplak et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22:1048-1057). La función  $f(x)$  se aplica en el eje de las 3 coordenadas cartesianas usando la siguiente fórmula:

$$f(x) = \left( s\sqrt{2\pi} \right)^{-3} \times \exp\left( -\frac{(x-u)^2}{2s^2} \right),$$

siendo  $x$  y  $u$ , respectivamente, las coordenadas cartesianas de un punto de la rejilla y un átomo de aminoácido muestreado, y  $s = r/1,6$  ( $r$  = radio de covalencia del átomo). El muestreo se repite para todas las conformaciones del aminoácido y los resultados obtenidos se promedian en todos los puntos de la rejilla tridimensional. El muestreo lipófilo considera solo los átomos lipófilos de la cadena lateral del aminoácido. El valor en un punto de la rejilla se calcula con la misma función gaussiana  $f(x)$  sin ponderación. Como resultado, los dos conjuntos de conformaciones de instantáneas de picosegundos de las simulaciones de dinámica molecular, de los dos anticuerpos que se comparan, se muestrean por la misma rejilla tridimensional. La similitud electrostática (sim-elec), entre el anticuerpo  $a$  y el anticuerpo  $b$ , puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$sim - elec = \frac{\sum_{i=1}^{445746} (|x_i^a + x_i^b| - |x_i^a - x_i^b|)}{\sum_{i=1}^{445746} (x_i^a + x_i^b)}$$

La similitud lipófila se calcula con la misma fórmula aplicada a los datos generados por el muestreo lipófilo previamente descrito.

5 El modelo de la línea germinal humana  $\nu\lambda 2$ -vh4 muestra la similitud cuatridimensional más alta (similitud total = 50 %) de sus 60 aminoácidos más flexibles con respecto a los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo murino 16D7. El modelo de la línea germinal humana  $\nu\lambda 2$ -vh4 ha sido así usado para sustituir los restos flexibles del anticuerpo murino 16D7. Antes, los aminoácidos de las dos secuencias se alinearon según la superposición óptima de los carbonos  $\alpha$  de los modelos de homología 3D correspondientes. Se buscaron motivos no deseados en las secuencias humanizadas resultantes usando una búsqueda de blast, como se describe previamente en el párrafo 41 anterior. Además, se buscaron epítopes de linfocitos B o linfocitos T conocidos en las secuencias humanizadas resultantes usando la base de datos IEDB como se describe en el párrafo 44, arriba.

15 La mejor correspondencia de secuencia en IEDB para la cadena ligera (LC7) fue PGKAPQLLIYRMSNL (SEQ ID NO: 52), que cubre CDR2. La secuencia presenta el 73 % de identidad de secuencia con el péptido PGKAPKLLIYAASSL (SEQ ID NO: 53) que muestra unión a HLA-DRB1 0404\* pero no se ha demostrado que sea inmunogénico en el hombre (J Immunol (1995)155, 5655).

La mejor correspondencia en IEDB para la cadena pesada (HC4 y HC5) fue SLIDYGVNWIRQPPG (SEQ ID NO: 54) que cubre CDR1 pero tiene diferencia de restos significativa como se tipifica por una identidad de secuencia del 40 % obtenida de una búsqueda de BLAST dentro de la base de datos IEDB.

20 Se obtuvieron dos versiones para la cadena pesada (HC4 y HC5) y una versión para la cadena ligera (LC7). Ambas versiones de la cadena pesada derivan del modelo de la línea germinal humana  $\nu\lambda 2$ -vh4. HC5 es una variante de HC4 con una mutación adicional para tratar un posible resto problemático: un posible sitio de desamidación donde la asparagina, N60, se cambia a un resto de prolina.

Las mutaciones introducidas mediante la humanización de las cadenas variables están en minúscula y subrayadas y las CDR están subrayadas. No están incluidos los dominios constantes.

25 LC7:

DIVMTQAAPSVAVTPgqSVSISCRSSKSLHSSGKTYLYWFLQhPGkaPQ  
 LLIYRMSNLASGVPDRFSGSGTAFTLlISgVqAEDVGVVYYCMQHLEYP  
YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:55)

HC4:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
 PGKGLEWLGVIWGDGTTYNSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLITDDT  
 AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:56)

HC5:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP  
 PGKGLEWLGVIWGDGTTYpSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLITDDT  
 AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:57)

30

Cadena ligera (numeración secuencial)	(LC7)	
ARG16	GLY	
GLU17	GLN	
ARG44	HIS	
GLN47	LYS	
SER48	ALA	
ARG79	THR	
ARG82	GLY	
GLU84	GLN	
En total para VL	8 mutaciones	
Cadena pesada	(HC4)	(HC5)
LYS5	GLN	GLN
ASN60	ASN	PRO
ARG70	SER	SER
ASN73	THR	THR
GLN75	LYS	LYS
GLN86	THR	THR
En total para VH	5 mutaciones	6 mutaciones

**EJEMPLO 17: FARMACOCINÉTICA**

El estudio se realiza con un número adecuado de animales (por ejemplo, 4 en un estudio; 2 para dosis única y 2 para dosis repetida, 5 dosis semanales) sanos, pesando los monos cinomolgos macho criados específicamente entre 2,0 y 5,4 kg y oscilando de 2 a 7 años de edad. Los animales pueden ser asignados a dos grupos de tratamiento, uno que recibe anticuerpos IgG4 de control y un grupo que recibe 16D7 humanizado. Los monos en cada grupo se administran con una dosis en bolo intravenosa única, por ejemplo, 2,5-10 mg/kg en un volumen de dosis de 2-3 ml/kg, o 5 dosis semanales, i.v. Se recogen muestras de sangre en diversos momentos de tiempo después de cada administración de dosis y se procesan para obtener plasma. Las muestras de plasma se analizan para concentración de mAb IgG4 y CXCR5 totales usando un ELISA.

**EJEMPLO 18: ESTUDIOS COMPARATIVOS**

Algunos de los presentes anticuerpos se compararon con anticuerpos comercialmente disponibles en experimentos alineados. MAB190, disponible de R & D Systems, es un mAb de ratón. RF82B es un anti-CXCR5 humano de rata disponible de BD. El clon 2C1 es un mAb de ratón con una marca GST disponible de Abnova. Los diversos anticuerpos humanizados descritos en el presente documento se isotipificaron usando reactivos y métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquellos enseñados en el presente documento tienen una cadena ligera κ, muchos son IgG1, mientras que 46C9, 68D3 y H28 IgG2a. La mayoría de los anticuerpos se unen al extremo amino de CXCR5, y varios de los anticuerpos compiten entre sí para unirse al mismo epítipo o región.

El anticuerpo BD se une poco a CMSP humanas.

Aunque los anticuerpos generalmente no se unieron a células de cinomolgo, lo hicieron 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 de la presente invención.

Se encontró que 16D7 era de afinidad más alta, al menos 10 veces, que los anticuerpos comerciales, y tiene una constante de disociación 100 veces mejor que los otros anticuerpos.

**EJEMPLO 19: AUMENTO DE ESCALA**

Se produjo cada variante de anticuerpo monoclonal en células HEK293 FS™ cultivadas en suspensión por transfección transitoria de dos plásmidos de expresión que codifican la cadena pesada o ligera complejados con 293fectin™ (Invitrogen). Se recogieron proteínas secretadas ocho días después de la transfección y se centrifugaron. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A (ProSepvA, Millipore) después de la elución de la columna con citrato 25 mM a pH 3, tampón NaCl 0,15 M. Los anticuerpos monoclonales se formularon en PBS y se filtraron en 0,22 μm. La concentración de proteína se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm. Cada lote se analizó por SDS-PAGE (Nupage Bistris/ MES-SDS 10 %) en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero. Cada

lote de proteína también se analizó por filtración en gel (Tricorn 10/300 GL Superdex 200) para determinar la homogeneidad del monómero y la presencia de especies de alto peso molecular.

De 240 ml de cultivos, estuvieron disponibles un total de 30 a 40 mg de ocho anticuerpos monoclonales de variante 16D7 y de calidad apropiada para las posteriores pruebas *in vitro* e *in vivo*.

- 5 Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Tales equivalentes pretenden estar englobados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS, DERIVADOS DE LOS MISMOS Y SU USO

5

<130> 190809-14330601

<140>

<141>

10

<150> 60/968.792

<151> 29-08-2007

<160> 57

15

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 36

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Thr Ser Leu Val Glu
           20           25           30

Asn His Leu Cys
           35
    
```

25

<210> 2

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (18)  
<223> a, c, g o t  
5  
<400> 2  
ctccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32  
<210> 3  
10 <211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> (18)  
20 <223> a, c, g o t  
<400> 3  
ctccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35  
25 <210> 4  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético  
<400> 4  
ggaggatcca tagacagatg ggggtgctgt ttggc 36  
35 <210> 5  
<211> 31



<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5

ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

10 <210> 6

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6

tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tggatgc 46

20

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7

30 ccaagctgtg tcctrtcc 18

<210> 8

<211> 32

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8

cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc 32

5

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9

15 wtctctrgag tcagtggg 18

<210> 10

<211> 32

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 10

cgactagtcg actggtggga agatggatac ag 32

<210> 11

<211> 112

30 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

ES 2 672 769 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 12

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

10

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

<210> 13

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 672 769 T3

<400> 13

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
           20           25           30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
 65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
           85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

5

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 14

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
           20           25           30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
 65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
           85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105           110

```

ES 2 672 769 T3

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 15

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
 1                               5                               10                               15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
                20                               25                               30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35                               40                               45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
          50                               55                               60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys
 65                               70                               75                               80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
          85                               90                               95
His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100                               105                               110
Lys
    
```

15 <210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

ES 2 672 769 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 17

<211> 238

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 17

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

# ES 2 672 769 T3

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

<210> 18

<211> 731

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 18

# ES 2 672 769 T3

```
gctagcacca tgggctggag ctgcatcate ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggegagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgcgc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccgga ccgcttcagc ggcaagcggca gcggcaccgc cttcacctcg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttcctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta cctcgggag gccaaagggtc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacia ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga ccaccaggg cctgtccage cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720

tgctgaagct t 731
```

<210> 19

5 <211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 19



ES 2 672 769 T3

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

<210> 20

<211> 731

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 20

# ES 2 672 769 T3

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcate ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgcgcc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
tacctactaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttcctcct ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaactteta ccctcgggag gccaaagggt agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacia ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccage cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

```

<210> 21

<211> 238

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 21

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val
  20           25           30
Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
  35           40           45
Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
  50           55           60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Leu Ala Ser
  65           70           75           80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
  85           90           95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
  100          105          110
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
  115          120          125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
  130          135          140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

```

# ES 2 672 769 T3

145		150		155		160									
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn
				165					170					175	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser
			180					185					190		
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala
		195					200					205			
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly
	210					215					220				
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235					

<210> 22

<211> 731

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 22

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcatt ctgttctctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcagc 240
ctggccagcg gctgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaactteta cctcgggag gccaaagggtc agtgaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tcctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcaca ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccagg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t                                     731
    
```

15

<210> 23

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 23

# ES 2 672 769 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 20 25 30  
 Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45  
 Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
 85 90 95  
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
 130 135 140  
 Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 165 170 175  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 195 200 205  
 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 210 215 220  
 Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 355 360 365

ES 2 672 769 T3

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 450 455

<210> 24

<211> 1385

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 24

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcadc ctgttctctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgca ggagagcggc cccggcctgg tggccccag cgagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaaggcctt ggagtgctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacccca gcctgaagag ccgcctgagc atctccaagg acaacagcaa gagccagggtg 300
ttcctgaaga tgaacagcct gaccgccgcc gacaccgcca tgtactactg cgcccgcctc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccttc tggccccctg ctcccggctc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtctctc 600
gtggtgaccg tgccttcttc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tcttgccct 720
tctgcccctg cccctgagtt cctggcgcca cctagcgtgt tctgttccc tctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggaccctt gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc ggggtggtgc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggaactggt gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgcccctct ccactgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacacc tgcctctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctacce ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac cctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggaaa gtcccgggtg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcaagagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt 1385
    
```

15

<210> 25

<211> 22

ES 2 672 769 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

5

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg  
1 5 10 15

Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
20

<210> 26

<211> 12

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

15

Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile  
1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 27

25

Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp  
1 5 10

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 28

ES 2 672 769 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 29

<211> 111

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

10

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 672 769 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
 1           5           10
Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

5

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 31

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
 1           5           10
Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```



ES 2 672 769 T3

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 32

10

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
  1           5           10           15
Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
          20           25           30
Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
          65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
          85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
```

<210> 33

<211> 111

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

20

<400> 33

ES 2 672 769 T3

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Val Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

<210> 34

<211> 111

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 34

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ala Pro Leu Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

15

<210> 35

<211> 238

<212> PRT

ES 2 672 769 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 35

```

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

```

10

<210> 36

<211> 731

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

# ES 2 672 769 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 36

5

```
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttctctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc ccgcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc cccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcacagacc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccttcgggag gccaaagggtc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcaca ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccagg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731
```

<210> 37

<211> 456

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

15

<400> 37

ES 2 672 769 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln  
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
 130 135 140

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 165 170 175

# ES 2 672 769 T3

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 195 200 205  
 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 210 215 220  
 Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 355 360 365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 450 455

<210> 38

<211> 1385

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 38

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcadc ctgttccctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggcccccag ccagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggtg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacagcg ccctgaagag ccgcctgagc atccgcaagg acaacagcca gagccagggtg 300
ttcctgaaga tgaacagcct gcagaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcctgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcgccg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggcccttg ctcccggctc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgcctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgcctgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttctc ctcctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcttgccctg ccctgagtt cctgggcgga cctagcgtgt tctgttccc tctaagcct 780
aaggacacc tgatgatctc ccggaccctc gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc ggggtggtgtc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggaactggt gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgcccctct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacacc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctacc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac cctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggaaa gtcccggtgg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc cagaagtccc tgccctgtc tctgggctga 1380
agctt
    
```

5 <210> 39

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 39

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15
Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val
  20           25           30
Thr Pro Gly Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
  35           40           45
Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
  50           55           60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
  65           70           75           80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
  85           90           95
Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
  100          105          110
    
```

15

# ES 2 672 769 T3

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

<210> 40

<211> 731

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 40

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttctctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc ccagcgtgg ccgtgacccc cggcgccagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgcgc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccg cgccttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcacctctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaa gctggagatca agcgtacggg ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttcctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaagggt agtggagggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacia ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccagg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t                                     731
    
```

15

<210> 41

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial



ES 2 672 769 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 41

5

```

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

```

<210> 42

<211> 731

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 672 769 T3

<400> 42

```
gctagcacca tgggctggag ctgcatcacc ctgttccctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc cggcgcaccg 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc cccagctgc tgatctaccg cctgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccca ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcacctg 300

cgcacagccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta cctcgggag gccaaagggt agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtcgg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tcctgtcct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcaca ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccagg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731
```

5

<210> 43

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 43

15

# ES 2 672 769 T3

```

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

```

<210> 44

5 <211> 731

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 44

# ES 2 672 769 T3

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcate ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc ccagcgtgg ccgtgacccc cggcgccagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagage ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgcgcc cggccagage ccccagctgc tgatctaccg cctgagcagc 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
tacctctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctoct 420
tccgtgttca tcttcctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtgggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaagggtc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtoct ccacctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacia ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga ccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcagc 720
tgctgaagct t 731

```

<210> 45

<211> 456

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 45

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
  20           25           30
Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
  35           40           45
Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
  50           55           60
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro
  65           70           75           80
Ser Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
  85           90           95
Val Phe Leu Lys Val Thr Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr
  100          105          110

```

ES 2 672 769 T3

Tyr Cys Ala Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125  
 Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
 130 135 140  
 Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 165 170 175  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 195 200 205  
 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 210 215 220  
 Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 245 250 255  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 260 265 270  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 275 280 285  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 290 295 300  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315 320  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 325 330 335  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 340 345 350  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 355 360 365  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 370 375 380  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 405 410 415  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 420 425 430  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 435 440 445  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 450 455

<210> 46

5 <211> 1385

ES 2 672 769 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 46

```

getagcacca tgggctggag ctgcatcadc ctgttccctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggcccccag cgagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatecact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggctg ggcgtgatct gggggcagcg caccacctac 240
tacaacccca gcctgaagag ccgcctgagc atcagcaagg acaacagcaa gagccagggtg 300
ttcctgaagg tgaccagcct gaccaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcctcctac 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcgcgg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggcccttg ctcccggctc acctccgagt ccaccgccg tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgcctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgcctgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttctc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgcctg cccctgagtt cctggcggga cctagcgtgt tcctgttccc tctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggaccct gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg taogtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctccggaggga gcagttcaat tccacctacc ggggtggtgc tgtgtgacc 960
gtgctgcacc aggactggt gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgcctcct ccacgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctctctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccgggtg caggagggca acgtctttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt
    
```

10

<210> 47

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 47

20

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
  1           5           10           15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
  35           40           45
    
```

ES 2 672 769 T3

Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ala  
65 70 75 80

Pro Leu Lys Gly Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
85 90 95

Val Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
130 135 140

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
195 200 205

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
210 215 220

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
225 230 235 240

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
260 265 270

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
290 295 300

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
325 330 335

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

ES 2 672 769 T3

370																			
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn				
385					390					395					400				
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu				
				405					410					415					
Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val				
			420					425					430						
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln				
		435					440					445							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly												
	450					455													

<210> 48

<211> 1385

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 48

```

gctagcacca tgggctggag ctgcatcacc ctgttctctg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggccccggg cggcagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaaggcctt ggagtggctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacgccc ccctgaaggg ccgctgagc atcagcaagg acaacagcaa gagccagggtg 300
ttcctgcaga tgaacagcct gaagaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcccgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggccccctg ctcccggctc acctccgagt ccaccgcccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgcgctgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttctc ctcccgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgcctcg cccctgagtt cctggcgga cctagcgtgt tcctgttccc tcctaagcct 780
aaggacacc tgatgatctc ccgaccctt gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc ggggtggtgc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgcccctct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacacc tgccctctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac cctcctgtg ctggactccg accgctcctt ctctctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccgggtg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt
1385
    
```

15

<210> 49

<211> 5

<212> PRT



ES 2 672 769 T3

<213> Homo sapiens

<400> 49

5

Glu Leu Leu Gly Gly

1

5

<210> 50

<211> 5

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

15

Met Ile Ser Arg Thr

1

5

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 6x marca His sintética

25

<400> 51

His His His His His His

1

5

<210> 52

30

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 672 769 T3

<400> 52

Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu  
1 5 10 15

5 <210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 53

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu  
1 5 10 15

15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 54

Ser Leu Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
1 5 10 15

30 <211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 672 769 T3

<400> 55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln His Pro Gly Lys Ala  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 56

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala  
 100 105 110

15

Lys

ES 2 672 769 T3

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 57

10

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
  1           5           10           15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
          20           25           30
Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35           40           45
Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Ser Ala Leu Lys
          50           55           60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
          65           70           75           80
Lys Met Asn Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
          85           90           95
Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
          100          105          110
Lys
```

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente al dominio extracelular de CXCR5 humano, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una de las características a a k:

- 5 a) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- b) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RMSNLAS (SEQ ID NO: 59), MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60), GFSLIDYGVN (SEQ ID NO: 61), VIWGDGTTY (SEQ ID NO: 62) e IVY (SEQ ID NO: 63);
- 10 c) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- d) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:
- 15 (i) las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RLSNLAS (SEQ ID NO: 64) y MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60), o las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RLSSNLAS (SEQ ID NO: 65) y MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60); y
- (ii) las secuencias de aminoácidos de GFSLIDYGVN (SEQ ID NO: 61), VIWGDGTTY (SEQ ID NO: 62) e IVY (SEQ ID NO: 63);
- 20 e) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable ( $V_L$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 y una cadena pesada variable ( $V_H$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
- f) el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32 y una cadena pesada variable que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34;
- g) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:
- 30 (i) las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RMSNLA (SEQ ID NO: 66), MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60); las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RLSNLA (SEQ ID NO: 67) y MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60); o las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLY (SEQ ID NO: 58), RLSSLA (SEQ ID NO: 68) y MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60); y
- (ii) las secuencias de aminoácidos de GFSLIDYGVN (SEQ ID NO: 61), VIWGDGTTY (SEQ ID NO: 62) e IVY (SEQ ID NO: 63).
- 35 h) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.
- i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43, y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47;
- 40 j) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57;
- k) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende:
- 45 (i) las secuencias de aminoácidos de RSSKSLHSSGKTYLYW (SEQ ID NO: 69), RMSNLA (SEQ ID NO: 66), MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 60); y
- (ii) las secuencias de aminoácidos de GFSLIDYGVN (SEQ ID NO: 61), VIWGDGTTY (SEQ ID NO: 62) e IVY (SEQ ID NO: 63);

en el que el anticuerpo o fragmento del mismo tiene una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-11}$  M a  $1 \times 10^{-15}$  M.

2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende uno o más dominios de la región constante.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  o combinaciones de los mismos.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 3, en el que el uno o más dominios de la región constante son de un anticuerpo IgG.
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG4.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de la reivindicación 7.
9. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo Fv monocatenario.
10. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o 9.
11. Un antagonista de CXCR5, que se une a CXCR5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad por CXCR5 que es cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de vejiga, leucemia de linfocitos T, leucemia de linfocitos B, lupus, síndrome de Sjögren, miastenia grave, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades inflamatorias crónicas, o injertos que experimentan rechazo, en el que el antagonista comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o 9 y en el que la enfermedad por CXCR5 es preferentemente artritis reumatoide.
12. Un método de preparación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o 9, que comprende:
- identificar una región variable humana homóloga a una región variable de un anticuerpo no CXCR5 humano;
  - identificar a partir de conformaciones moleculares de una región variable de dicho anticuerpo no CXCR5 humano aminoácidos que son flexibles y aminoácidos que flanquean dicho resto flexible y retienen la conformación molecular de dicha región variable;
  - identificar aminoácidos homólogos a dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) en dicha región variable humana;
  - sustituir dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) con dichos aminoácidos identificados de la etapa (c) para producir una región variable humanizada; y
  - unir dicha región variable humanizada de la etapa (d) con una secuencia humana para dar un polipéptido humanizado que se une específicamente a CXCR5.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende una de las siguientes características i) a iv):
- la etapa (b) comprende modelado de dinámica molecular;
  - la etapa (d) comprende no sustituir aminoácidos de más de 5 Å de una región determinante de la complementariedad;
  - el método comprende además confirmar que dicha región variable humanizada de la etapa (d) se parece a un anticuerpo humano comparando dicha secuencia de la región variable humanizada con las secuencias de una colección de secuencias de anticuerpo humano;
  - el método comprende además confirmar que dicha región variable humanizada de la etapa (d) se parece a un anticuerpo humano comparando dicha trayectoria de la región variable humanizada con las secuencias de una colección de trayectorias de anticuerpo humano;
  - la región variable humanizada de la etapa (d) no comprende un epítipo de linfocitos B o un epítipo de linfocitos T.