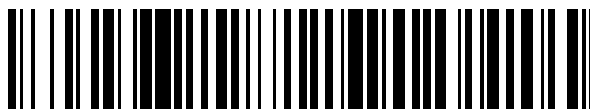


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 001**

51 Int. Cl.:

A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012** **PCT/US2012/064395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013** **WO13071068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012** **E 12787343 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2776032**

54 Título: **Tratamiento de neoplasias hematológicas con un anticuerpo anti-CXCR4**

30 Prioridad:

09.11.2011 US 201161557815 P
09.12.2011 US 201161569113 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.03.2019

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

KUHNE, MICHELLE R.;
PAN, CHIN y
CARDARELLI, JOSEPHINE M.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 705 001 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

Tratamiento de neoplasias hematológicas con un anticuerpo anti-CXCR4

- 5 A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones entre paréntesis por nombre del autor y fecha, o por N.º de Patente o N.º de Publicación. Las citas completas para estas publicaciones pueden encontrarse al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Campo de la invención

- 10 La presente descripción se refiere al uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al receptor CXCR4 expresado en la superficie de una célula de mieloma múltiple en un método de tratamiento de mieloma múltiple (MM).

Antecedentes de la invención

- 15 Las quimioquinas son una familia de aproximadamente 50 proteínas pequeñas que modulan el tráfico celular y la angiogénesis y también juegan un papel importante en el microambiente del tumor (Vicari et al, 2002). Dependiendo de su estructura, las quimiocinas se clasifican como quimiocinas C-C (que contienen un motivo de cisteína a cisteína) o quimiocinas C-X-C (que contienen un motivo cisteína-X-cisteína). Los receptores que unen tales quimiocinas por lo tanto se clasifican como miembros de la familia de CCR o de la familia CXCR, respectivamente.

- 20 Uno de los miembros de la familia de CXCR es el receptor CXCR4 (CXCR4), también conocido como CD184, un receptor acoplado de la proteína G de siete dominios transmembrana del que consiste en una cola N-terminal extracelular y tres bucles extracelulares. El extremo carboxi terminal intracelular de CXCR4 está acoplado a una proteína G heterotrimérica que consiste de subunidades β y γ y una subunidad G_i α sensible a la toxina de tosferina (Loetscher et al., 1994). Hasta la fecha, solamente un ligando para CXCR4, una quimiocina conocida como CXCL12 (también conocida, y utilizada de manera intercambiable en el presente documento, como células estromales derivadas de factor-1 o SDF-1) ha sido identificada (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996). La unión de CXCL12 a CXCR4 estimula la activación de la fosfolipasa C y, posteriormente, da como resultado una elevación del calcio libre citosólico. La ligadura de CXCR4 en última instancia conduce a la inducción de la quimiotaxis y la migración (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). CXCR4 también juega un papel en la embriogénesis, homeostasis e inflamación. Los estudios con ratones modificados que son deficientes en CXCR4 o CXCL12 implican la vía CXCR4/CXCL12 en la vascularización de órganos, así como en los sistemas inmunes y hematopoyéticos (Tachibana et al., 1998). Además, CXCR4, se ha demostrado que funciona como un correceptor para aislados de VIH-1 linfotróficos T (Feng et al, 1996).

- 35 En adultos sanos, CXCR4 se expresa predominantemente en células del linaje hematopoyético, incluyendo células B y T, monocitos, macrófagos, NK y células dendríticas, así como células progenitoras de médula ósea (BM) CD34⁺ (Lee et al., 1999). Los niveles bajos de CXCR4 también se expresan en las células endoteliales y epiteliales, astrocitos y neuronas (Gupta et al., 1998; Hesselgesser et al, 1997). CXCL12 se ha mostrado que induce la migración de células endoteliales y la proliferación y, junto con VEGF, se ha mostrado que mejoran la neoangiogénesis (Guleng et al., 2005). La sobreexpresión de CXCR4 también se ha encontrado en 75 % de los cánceres, incluyendo leucemias, linfomas, tumores de páncreas, de mama, de ovario, de pulmón, de próstata y colorectales, y la interacción entre CXCL12 y es esencial para migrar y mantener las células madre hematopoyéticas dentro del microambiente de la BM (Mohle et al., 1998). Plerixafor (AMD3100; Mozobil), un antagonista biciclám de CXCR4, se ha mostrado que moviliza las células madre en el torrente sanguíneo (Dar et al., 2011). AMD3100 y AMD3465, otro antagonista biciclám CXCR4, aumentan la quimiosensibilización de las células tumorales de leucemia mieloide aguda (AML) bloqueando la señalización de CXCR4/CXCL12 (Nervi et al, 2009; Zeng et al, 2009).

- 50 El uso del antagonista de CXCR4 AMD3100 para estimular la movilización de células madre desde la médula ósea se describe en Wemeau et al., *Hématologie* 2009, 15(3): 194-196. El documento US 2011/0070244 se refiere al uso de inhibidores de CXCR4 para interrumpir o impedir la señalización de CXCR4/SDF en células cancerosas. Li et al. (*Blood* 2002, 100(11), artículo n.º 5027) informa que un anticuerpo 12G5 anti-CXCR4 o un anticuerpo B-E8 anti-IL-5 bloquearon la proliferación artificial inducida por SDF-1 α de células de mieloma *in vitro*.

- 55 AML es un cáncer de crecimiento rápido de la línea mieloide de las células de sangre, caracterizadas por el rápido crecimiento de las células blancas de la sangre anormales que se acumulan en la BM e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. En AML, CXCR4 se expresa altamente en la fracción CD34⁺ de células de BM. Menores niveles de CXCR4 en células de AML se correlacionan con un mejor pronóstico que resulta en una mayor supervivencia en general y libre de recaídas. La expresión del receptor CXCR4 inferior atenúa la migración de las células de AML primarias hacia CXCL12 expresadas en el medio ambiente quimio-prottegido de la BM (Tabor et al, 2004).

- 60 Mieloma múltiple (MM) es una forma de cáncer que resulta de la proliferación maligna de células plasmáticas. Después un linfoma de no Hodgkin, que es el segundo cáncer hematológico más frecuente, con aproximadamente 80.000 nuevos casos en todo el mundo (20.000 en los Estados Unidos), y aproximadamente 62.000 muertes al año (10.500

muerdes/año en los EE.UU.) (Jemal et al., 2008; 2009). Las células de MM crecen preferiblemente en la BM en donde interfieren con la producción de células sanguíneas normales y anticuerpos normales, lo que resulta en la inmunodeficiencia, la destrucción del esqueleto, hipocalcemia, BM e insuficiencia renal. Además de AML, los niveles de suero de CXCL12 son elevados en pacientes con MM, y la expresión CXCR4 aumenta en plasmocitoma extramedular, una manifestación de un estado avanzado de MM. Además, el bloqueo del eje de CXCL12/CXCR4 atenúa la migración de las células de MM y migración de estas células a la BM (Alsayed et al., 2007).

Los linfomas de no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés) incluyen cualquiera de un grupo diverso de cánceres de linfocitos diferentes a linfoma de Hodgkin. Los NHLs se pueden presentar a cualquier edad ya menudo se caracterizan por ganglios linfáticos más grandes que los normales, fiebre y pérdida de peso. Los diferentes tipos de NHL varían significativamente en su severidad, desde muy agresivo (de crecimiento rápido) hasta tipos (indolentes de crecimiento lento) y pueden estar formados por células B o células T. Los NHLs con células B incluyen el linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfóide pequeño (CLL/SLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células grandes inmunoblástico, linfoma linfoblástico de células B precursoras, y linfoma de células del manto. Los NHLs de células T incluyen micosis fungoides, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma linfoblástico de células T precursoras. Se estima que habrá alrededor de 70.000 nuevos casos de NHLs en los Estados Unidos en 2012, que se traducirá en aproximadamente 19.000 muertes. La expresión CXCR4 de alto nivel se ha demostrado en 18 de las 19 líneas de células de NHL primarias analizadas (Bertolini et al., 2002). También se ha mostrado que CXCL12 mejora la migración de las células de NHL foliculares (Corcione et al., 2000), y el circuito CXCR4-CXCL12 parece ser crucial para la migración de las células de CLL (Burger et al., 1999).

Los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 humanos que exhiben numerosas propiedades deseables previamente se han descrito en la Publicación Internacional PCT No. WO 2008/060367. Como se describe en WO 2008/060367, los estudios *in vitro* demuestran que estos anticuerpos monoclonales se unen a las células que expresan CXCR4 con baja afinidad nanomolar, el bloque CXCL12 se une a las células que expresan CXCR4, e inhiben la migración y el flujo de calcio inducido por CXCL12 con valores de EC₅₀ nanomolares bajos. Uno de los anticuerpos monoclonales totalmente humanos, BMS-936564, (designado F7 en WO 2008/060367, y también designado previamente MDX-1338, todas las tres designaciones se usan de forma intercambiable en este documento), que exhibe propiedades anti-tumorales sólidas inesperadamente ventajosas en estudios preclínicos, ha sido seleccionado para una mayor investigación para determinar su actividad contra cánceres hematológicos *in vivo* y para aclarar además los mecanismos que subyacen a su actividad anti-cáncer. El anticuerpo BMS-936564 también ha entrado en los estudios clínicos Fase I en pacientes con AML, MM, y NHLs recurrentes/refractarios.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4, o a un kit que comprende una dosis de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para su uso en un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o la inducción de apoptosis de células de mieloma múltiple en un sujeto afligido con mieloma múltiple y de esta manera tratar al sujeto, en el que el receptor CXCR4 se expresa en la superficie de células de mieloma múltiple en el sujeto y en el que el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo o el fragmento del mismo para inhibir directamente el crecimiento y/o la proliferación y/o inducir la apoptosis de las células de mieloma múltiple en el sujeto.

La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen a CXCR4 humano y que exhiben numerosas propiedades que son deseables en un anticuerpo terapéutico. Estas propiedades incluyen la capacidad de unirse con afinidad baja nM a CXCR4 humano nativo expresado en una superficie celular, inhibe la unión de SDF-1 a CXCR4 humano con una EC₅₀ para la inhibición de 50 nM o menos, inhibir el flujo de calcio inducido por SDF-1 en las células que expresan CXCR4 con una EC₅₀ para la inhibición de 3 nM o menos, inhibir la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 con una EC₅₀ para la inhibición de 50 nM o menos, inhibir la formación de tubos capilares por las células endoteliales de la vena umbilical humana (HuVECs), inducir apoptosis en una amplia variedad de células que expresan CXCR4, inhibir la proliferación de células de tumor *in vitro*, inhibir el crecimiento de tumor *in vivo*, inhibir la metástasis de células de tumor CXCR4⁺ y/o aumentar el tiempo de supervivencia de un sujeto portador de un tumor CXCR4⁺.

El anticuerpo monoclonal aislado es preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal:

- (a) se une al CXCR4 humano nativo expresado en una superficie celular;
- (b) inhibe la unión de SDF-1 (CXCL12) a CXCR4 humano;
- (c) inhibe el flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4 humano;
- (d) inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 humano; y
- (e) inhibe la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana.

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

Esta descripción también proporciona un método para tratar un sujeto afectado con un cáncer que expresa CXCR4, incluyendo una neoplasia hematológica, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CXCR4 que se une específicamente al CXCR4 humano expresado en una superficie celular. El anticuerpo anti-CXCR4 puede ser un anticuerpo que inhibe la actividad de CXCR4. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CXCR4 induce la apoptosis de las células diana que expresan CXCR4. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CXCR4 puede utilizarse como monoterapia. Alternativamente, el anticuerpo anti-CXCR4 puede utilizarse en combinación con otros agentes anti-cáncer. Preferiblemente, la neoplasia hematológica es MM, AML, o NHLs. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Más preferiblemente, el anticuerpo es BMS-936564.

La descripción proporciona además un uso de un anticuerpo CXCR4 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un sujeto afligido con un cáncer, incluyendo neoplasia hematológica.

Esta descripción también proporciona un kit para el tratamiento de un cáncer en un sujeto, el kit comprende: (a) una dosis de un anticuerpo anti-CXCR4; y (b) instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR4 en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CXCR4 es BMS-936564.

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) y secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de la región variable de cadena pesada (1A) del anticuerpo monoclonal humano F7 (BMS-936564). Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 5) y CDR3 (SEQ ID NO: 9) están delimitadas y las derivaciones de la línea germinal V, D y J son indicadas. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de la región variable de cadena ligera (1B) de F7 también se muestra. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 17) y CDR3 (SEQ ID NO: 21) son delineadas y las derivaciones de la línea germinal V y J son indicadas.

La Figura 2 muestra la unión de anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7, F9, DL y E2 a las células CEM que expresan CXCR4 humano nativo en la superficie celular.

La Figura 3 muestra la competencia de anticuerpos para la unión a células CEM entre anticuerpo anti-CXCR4 marcado con FITC F9 y un panel de anticuerpos anti-CXCR4 humanos sin marcar.

Las Figuras 4A-4D muestran un análisis citométrico de flujo de la unión de BMS-936564. El anticuerpo se une a líneas celulares de AML Nomo-1 y HL-60(4A), CXCR4-transfectadas R1610, líneas celulares CEM y Ramos (4B), líneas celulares de MM, JJN-3R, y MOLP8 (4C), y células de la sangre de pacientes con AML primario (4D).

La Figura 5 muestra la inhibición de la unión de CXCL12 marcado con ¹²⁵I a CXCR4 expresado en células CEM por anticuerpos humanos anti-CXCR4 F7 (BMS-936564), F9 y D1. El anticuerpo E2 no inhibe la unión de CXCL12 a las células CEM.

Las Figuras 6A-6C muestran la inhibición de la unión de CXCL12 marcado con ¹²⁵I a células CEM por el anticuerpo anti-CXCR4 MDX-1338 (BMS-936564) (6A) o un anticuerpo anti-CXCL12 (6B), y la inhibición de la unión de CXCL12 marcado con ¹²⁵I a células Ramos mediante MDX-1338 (6C). Ensayos de unión de ligando se llevaron a cabo mediante la incubación de 100 pM de ¹²⁵I-CXCL12 con células CEM en la presencia de aumento de la concentración de MDX-1338, anti-CXCL12, o anticuerpo de control de isotipo. CXCL12 sin marcar se agregó en exceso molar de 1000 veces (100nM) para establecer la unión no específica (NSB). ¹²⁵I-CXCL12 sin anticuerpo o competidor no marcado fue agregado para establecer la unión total alcanzable (Total).

La Figura 7 muestra la inhibición del flujo de calcio inducida por CXCL12 (SDF-1) en células CEM por anticuerpos humanos anti-CXCR4 F7 (BMS-936564), F9 y D1. E2 no inhibe significativamente el flujo de calcio inducido por CXCL12.

Las Figuras 8A-8B muestran la inhibición del flujo de calcio inducido por CXCL12 en células CXCR4⁺ por anticuerpos anti-CXCR4 MDX-1338 (BMS-936564) o un anticuerpo anti-CXCL12. Ensayos de flujo de calcio se llevaron a cabo ya sea mediante la incubación de células Ramos (8A) o células CEM (8B) con colorante de calcio 4 en la presencia o ausencia del anticuerpo de prueba o un control de isotipo. Las células cargadas con colorante se incubaron a temperatura ambiente con 50 nM y 5 nM de CXCL12 con las células Ramos y CEM, respectivamente. El área bajo la curva de fluorescencia entre 20 y 200 segundos fue cuantificada y se calculó una EC₅₀.

La Figura 9 muestra la inhibición de la migración inducida por CXCL12 de células CEM por anticuerpos humanos anti-CXCR4 F7 (BMS-936564) y F9, mientras que los anticuerpos D1 y E2 no inhiben significativamente la migración.

Las Figuras 10A y 10B muestran la inhibición de la migración de células CXCR4⁺ inducida por CXCL12 por anticuerpos anti-CXCR4 MDX-1338 (BMS-936564) o un anticuerpo anti-CXCL12.

Ensayos de migración con las células Ramos (10A) y CEM (10B) se llevó a cabo en la presencia de 1,25 nM y 0,05 nM, de CXCL12 respectivamente. El número de células marcadas, que habían migrado en el compartimiento inferior, se midió en un lector de placa de fusión (PerkinElmer). Cada punto representa n = 3.

Las figuras 11A-11B muestran (11A) la inhibición de la proliferación de células tumorales Ramos *in vitro* por anticuerpos anti-CXCR4 humanos F7 (BMS-936564), F9 y E2, y (11B) la inhibición de la proliferación de células Ramos por MDX-1338 (BMS-936564), en comparación con ninguna inhibición por anti-CXCL12. En la figura 11B,

también se muestran los efectos de diversos péptidos antagonistas de CXCR4.

Las Figuras 12A-12C muestran la inhibición de la proliferación de células tumorales Ramos *in vivo* en un modelo de tumor subcutáneo por los anticuerpos humanos anti-CXCR4 F7 (BMS-936564) y F9. La Figura 12A muestra el promedio de la curva de crecimiento del volumen tumoral; La figura 12B muestra la mediana de la curva de crecimiento del volumen tumoral; y la Figura 12C muestra la mediana del % de cambio del peso corporal.

Las Figuras 13A-13B muestran el porcentaje de supervivencia de ratones tratados con el anticuerpo humano anti-CXCR4 F9 (13A), o el anticuerpo anti-CXCR4, BMS-936564, y un anticuerpo anti-CXCL12 (13B) en un modelo sistémico de células tumorales Ramos. BMS-936564 es altamente eficaz en este modelo sistémico Ramos, mientras que el Ab anti-CXCL12 no muestra ninguna eficacia.

Las Figuras 14A-14B muestran los resultados de un ensayo de apoptosis realizado mediante la incubación de las células Ramos durante 24 horas a 37°C con 10 µg/ml de MDX-1338 (BMS-936564) o control de isotipo. Las células se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (14A). Se determinó el porcentaje de células positivas para anexina V solamente o ambos anexina V y PI doble positivo (14B).

Las Figuras 15A-15B muestran que la inducción de la apoptosis por MDX-1338 (BMS-936564) es específica para CXCR4. MDX-1338 o el control de isotipo se agregaron a las células transfectadas con CXCR4 (15A) o células madre R1610 (15B) y se tiñeron con Anexina V-FITC y PI. Los porcentajes de células que fueron positivas para anexina V solamente o doblemente positivas tanto para anexina V y PI doble positivo son ilustrados.

La Figura 16 muestra la inhibición del crecimiento de tumor *in vivo* de un xenoinjerto de linfoma de células Ramos por un anticuerpo CXCR4 de bloqueo, MDX-1338 (BMS-936564), y un rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico) control positivo, y la ausencia de inhibición de crecimiento de tumor por un bloqueo del anticuerpo anti-CXCL12.

Las Figuras 17A-17B muestran la inhibición del crecimiento de tumor *in vivo* de una célula HL60 (17A) y un xenoinjerto de leucemia mieloide aguda Nomo-1 (17B) por MDX-1338 (BMS-936564). La citarabina como era de esperar no inhibió el crecimiento tumoral del tumor Nomo-1 resistente a citarabina.

Las Figuras 18A-18I muestran la inhibición del crecimiento de tumor *in vivo* de varios múltiples xenoinjertos de células de mieloma CXCR4+ por MDX-1338 (BMS-936564). Fig. 18A inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células MOLP8 tratadas con MDX-1338 solo o en combinación con lenalidomida o bortezomib; Fig. 18B, inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de células JJ-3R tratadas con MDX-1338 o lenalidomida o bortezomib; Fig. 18C, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células madre JJN-3 tratadas con MDX-1338 solo o en combinación con bortezomib; Fig. 18D, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células madre JJN-3 tratadas con MDX-1338 solo o en combinación con lenalidomida; Fig. 18E, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células RPMI-8226 por MDX-1338 solo o en combinación con lenalidomida (Revlimid®); Fig. 18F, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células RPMI-8226 por MDX-1338 solo o en combinación con bortezomib (VELCADE®); Fig. 18G, inhibición del crecimiento del tumor de xenoinjertos de células MM.1S por MDX-1338 solo o en combinación con lenalidomida; Fig. 18H, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células OMP-2 por MDX-1338 solo o en combinación con bortezomib; Fig. 18I, inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjertos de células OPM-2 por MDX-1338 solo o en combinación con lenalidomida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso médico de un anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento del mismo definido en las reivindicaciones. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal aislado, particularmente un anticuerpo monoclonal humano, que se une específicamente al CXCR4 humano nativo expresado en una superficie celular. En ciertas modalidades, los anticuerpos de esta descripción se derivan de secuencias particulares de la línea germinal de cadena pesada y ligera y/o comprenden características particulares estructurales tales como regiones variables o CDRs que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. Esta descripción también se refiere a métodos para usar los anticuerpos para modular la actividad de CXCR4 en, o de lo contrario tratar, las enfermedades o trastornos asociados con la expresión de CXCR4 o involucra la vía de CXCR4/CXCL12, tales como cánceres, particularmente neoplasias hematológicas, metástasis tumoral, infección por VIH, inflamación y angiogénesis.

Términos

Con el fin de que la presente descripción puede ser entendida más fácilmente, ciertos términos son definidos primero. Tal como se usa en esta solicitud, salvo que se exprese lo contrario en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se establece a continuación. Las definiciones adicionales se exponen en toda la solicitud.

“Administración” se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Las rutas preferidas de administración para los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención incluyen administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La frase “administración parenteral” como se usa aquí significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, intraesternal, así como electroporación

in vivo. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces, y/o durante uno o más períodos prolongados.

Un “anticuerpo” (Ab) incluye, sin limitación, una glicoproteína inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno y comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno del mismo. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (Abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones variables (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

Los anticuerpos normalmente se unen específicamente a su antígeno cognado con alta afinidad, reflejada por una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} hasta 10^{-11} M^{-1} o menos. Cualquier K_D mayor de aproximadamente 10^{-4} M^{-1} se considera generalmente que indica unión no específica. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo que “se une específicamente” a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, preferiblemente 10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos, y lo más preferiblemente entre 10^{-8} M y 10^{-10} M o menos, pero no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es “sustancialmente idéntico” a un antígeno dado si exhibe un alto grado de identidad de secuencia con el antígeno dado, por ejemplo, si presenta por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, preferiblemente por lo menos 95 %, más preferiblemente por lo menos 97 %, o incluso más preferiblemente por lo menos 99 de identidad de secuencia con la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al CXCR4 humano también puede tener reactividad cruzada con antígenos CXCR4 de ciertas especies de primates, pero no puede reaccionar de manera cruzada con antígenos CXCR4 de ciertas especies de roedores o con un antígeno que no sea el CXCR4, por ejemplo, un antígeno PD-L1 humano.

La inmunoglobulina se puede derivar de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluyendo, pero no limitado a IgA, IgA secretor, IgE e IgM. Subclases de IgG también son bien conocidas por las personas experimentadas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a IgG1 humana, IgG2, IgG3 e IgG4. “Isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de cadena pesada. “Anticuerpo” incluye, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos de origen natural y de origen no natural; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos totalmente sintéticos; y anticuerpos de cadena sencilla. Un anticuerpo no humano puede humanizarse por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Cuando no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique lo contrario, el término “anticuerpo” incluye también un fragmento de unión al antígeno o una porción de unión al antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, e incluye un fragmento o porción monovalente y divalente, y un anticuerpo de cadena sencilla.

Un “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al CXCR4 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CXCR4). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al CXCR4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas CXCR4 de diferentes especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Las frases “un anticuerpo de anti-antígeno”, “un anticuerpo que reconoce un antígeno”, y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan aquí de forma intercambiable con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno.”

El término “anticuerpo monoclonal” (“mAb”) se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, en este caso, moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas, y que exhiben una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por hibridoma, recombinante, transgénico u otras técnicas conocidas por las personas experimentadas en la técnica.

Un anticuerpo “humano” (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que las regiones de marco variable y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina

de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en el presente documento pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, han sido injertadas en secuencias estructurales humanas. Los términos anticuerpos “humanos” y “anticuerpos completamente humanos” se utilizan como sinónimos.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios de CDR de un anticuerpo no humano se sustituyen con aminoácidos correspondientes derivados de inmunoglobulinas humanas. En una modalidad de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios de CDR se han sustituido con aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR están sin cambios. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo “humanizado” conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de una especie y las regiones constantes se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano.

Una “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (también llamado un “fragmento de unión al antígeno”) se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo completo.

Un “cáncer” se refiere a un amplio grupo de varias enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. División y crecimiento celular no regulado resulta en la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden metastatizar a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo.

El término “CXCR4” (“receptor de quimiocinas C-X-C 4”) incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para CXCR4 pueden, en ciertos casos, tener una reacción cruzada con CXCR4 a partir de especies distintas de la humana. En otras modalidades, los anticuerpos específicos para CXCR4 humano pueden ser completamente específicos para CXCR4 humano y no pueden exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada. El término “CXCR4 humano” se refiere a la secuencia humana CXCR4, tal como la secuencia de aminoácidos completa de CXCR4 humano que tiene número de acceso GENBANK® P61073 (SEQ ID NO: 51). CXCR4 también se conoce en la técnica como, por ejemplo, LESTR, fusina o CD184. La secuencia de CXCR4 humano pueden diferir del CXCR4 humano de la SEQ ID NO:51 al tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas, y el CXCR4, tiene sustancialmente la misma función biológica que el CXCR4 humano de la SEQ ID NO: 51. Por ejemplo, una función biológica de CXCR4 humano es tener un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 que está unido específicamente por un anticuerpo de la presente descripción o la función biológica de CXCR4 humano es la unión de quimioquinas o implicación en el proceso metastásico.

Una secuencia de CXCR4 humano particular será generalmente por lo menos 90 % idéntica en la secuencia de aminoácidos al CXCR4 humano de la SEQ ID NO:51 y contiene residuos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos de ser humano en comparación con secuencias de aminoácidos CXCR4 de otras especies (por ejemplo, murino). En ciertos casos, un CXCR4 humano puede ser por lo menos 95 %, o incluso por lo menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos al CXCR4 de la SEQ ID NO:51. En ciertas modalidades, una secuencia de CXCR4 humano no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos desde el CXCR4 de la SEQ ID NO:51. En ciertas modalidades, el CXCR4 humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 aminoácido de diferencia del CXCR4 de la SEQ ID NO:51. El porcentaje de identidad puede ser determinado como se describe en el presente documento.

Un “cáncer que expresa CXCR4” o “cáncer CXCR4⁺” es un cáncer en el que las células malignas que caracterizan este cáncer expresan CXCR4 en la superficie celular, preferiblemente expresan un alto nivel de CXCR4.

El término “neoplasia hematológica” en el presente documento incluye un linfoma, leucemia, mieloma o una neoplasia linfoide, así como un cáncer del bazo y los ganglios linfáticos. Linfomas a modo de ejemplo que son susceptibles de tratamiento con los anticuerpos anti-CXCR4 descritos en el presente documento incluyen tanto los linfomas de células B y linfomas de células T. Los linfomas de células B incluyen tanto los linfomas de Hodgkin y la mayoría de los linfomas de no Hodgkin. Ejemplos no limitantes de los linfomas de células B incluyen linfoma difuso de células B (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma del tejido linfático asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés), linfoma linfocítico de células pequeñas (se superpone con la leucemia linfocítica crónica), el linfoma de células de manto (MCL, por sus siglas en inglés), linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de células B grandes, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma marginal nodal de células B (NMZL, por sus siglas en inglés), linfoma esplénico de la zona marginal (SMZL), linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide. Ejemplos no

limitantes de los linfomas de células T incluyen linfoma extraganglionar de células T, linfomas cutáneos de células T, linfoma de células grandes anaplásicas, y linfoma angioinmunoblástico de células T. Las neoplasias hematológicas también incluyen leucemia, tal como, pero no limitada a, leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica (CLL; también llamada leucemia linfocítica crónica), leucemia mielógena aguda (AML; también llamada leucemia linfocítica aguda), leucemia mielógena crónica (CML, por sus siglas en inglés), leucemia prolinfocítica de células B (B-PLL, por sus siglas en inglés), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y mielodisplasia (MDS, por sus siglas en inglés). Neoplasias hematológicas incluyen además mielomas, tales como, pero no limitados a, mieloma múltiple (MM) y mieloma múltiple ardiente (SMM, por sus siglas en inglés). Otros cánceres hematológicos asociados con células B y/o células T son abarcados por el término neoplasia hematológica. Por ejemplo, neoplasias hematológicas también incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo células dendríticas, plaquetas, eritrocitos, células asesinas naturales, y leucocitos polimorfonucleares, por ejemplo, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos. Debe quedar claro para las personas experimentadas en la técnica que estas pre-neoplasias y neoplasias frecuentemente tienen nombres diferentes debido a sistemas de clasificación cambiantes, y que los pacientes que tienen linfomas clasificados bajo nombres diferentes pueden beneficiarse también de los regímenes terapéuticos descritos en el presente documento.

El término “SDF-1” se refiere al factor derivado de células estromales 1, que es un ligando para CXCR4. El término “SDF-1” abarca diferentes isoformas de SDF-1, tal como SDF-1 α y SDF-1 β . La secuencia de aminoácidos de SDF-1 α humano tiene número de acceso de GENBANK® NP_954637. La secuencia de aminoácidos de SDF-1 β humano tiene número de acceso de GENBANK® NP_000600. SDF-1 humano también se describe en la patente Estadounidense No 5756084. SDF-1 también se conoce como CXCL12. La secuencia de aminoácidos de SDF-1 humano puede diferir del SDF-1 de NP_954637 o NP_000600, tal como se describe en el presente documento para CXCR4.

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

Un “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano” incluye, pero no está limitado a, vertebrados tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, conejos, hurones, roedores tales como ratones, ratas y conejillos de indias, especies aviarias, tales como pollos, anfibios, y reptiles. En modalidades preferidas, el sujeto es un mamífero tal como un primate no humano, oveja, perro, gato, conejo, hurón o roedor. En modalidades más preferidas, el sujeto es un humano. Los términos “sujeto”, “paciente” e “individuo” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosificación terapéuticamente eficaz” de un fármaco o agente terapéutico, tal como un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención, es cualquier cantidad del medicamento que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de la deficiencia o discapacidad debido a la afección de la enfermedad. Una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una “cantidad profilácticamente eficaz” o una “dosis profilácticamente eficaz”, que es cualquier cantidad del medicamento que, cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o de sufrir una recurrencia de la enfermedad, inhibe el desarrollo o recurrencia de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad se puede evaluar usando varios métodos conocidos por la persona experimentada en la técnica, tal como en sujetos humanos durante los ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales predictivos de eficacia en seres humanos, o por ensayo de la actividad de la agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente anti-cáncer promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En modalidades preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. “Promover la regresión del cáncer” significa que la administración de una cantidad eficaz del fármaco, solo o en combinación con un agente antineoplásico, resulta en una reducción en el crecimiento o el tamaño del tumor, necrosis del tumor, una disminución en la gravedad de por lo menos un síntoma de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, una prevención de la deficiencia o discapacidad debido a la afección de la enfermedad, o de otra manera la mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Además, los términos “eficaz” y “eficacia” en relación con un tratamiento incluye tanto la eficacia farmacológica y la seguridad fisiológica. Eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión del cáncer en el paciente. Seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y/o del organismo (efectos adversos) que resultan de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe preferiblemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor en por lo menos aproximadamente 20 %, más

preferiblemente en por lo menos aproximadamente 40 %, aún más preferiblemente en por lo menos aproximadamente 60 %, y aún más preferiblemente en por lo menos aproximadamente 80 % con respecto a sujetos no tratados. En las modalidades más preferidas, una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor, en este caso, inhibe preferiblemente el crecimiento celular o el crecimiento del tumor por 100 %. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor puede ser evaluada en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición se puede medir *in vitro* mediante ensayos conocidos por la persona experimentada en la técnica. En otras modalidades preferidas de la invención, la regresión del tumor se puede observar y continuar durante un período de por lo menos aproximadamente 20 días, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 40 días, o incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 60 días.

“Tratamiento” o “terapia” de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso llevado a cabo en, o la administración de un agente activo, al sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, reducir o prevenir la aparición, progresión, el desarrollo, la gravedad o la repetición de un síntoma, complicación, condición o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad.

Varios aspectos de esta descripción se describen con más detalle en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-CXCR4

Anticuerpos anti-CXCR4 monoclonales humanos de esta descripción se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en este documento como el HUMAB MOUSE® (Lonberg et al, 1994) y KM MOUSE® (documento WO 02/43478), respectivamente. La producción de anticuerpos anti-CXCR4 a modo de ejemplo de esta descripción se describe en detalle en el documento WO 2008/060367. Los anticuerpos de esta descripción se caracterizan por características o propiedades particulares funcionales. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a CXCR4 humano nativo expresado en una superficie celular. Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se une al CXCR4 con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 1×10^{-7} M o menos. Los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción exhiben preferiblemente una o más de las siguientes características:

- (a) unión a CXCR4 humano nativo expresado sobre la superficie de la célula;
- (b) inhibición de la unión de SDF-1 a CXCR4;
- (c) inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4;
- (d) inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4;
- (e) inhibición de la formación del tubo capilar mediante células endoteliales de vena umbilical humana;
- (f) unión a CXCR4 humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos;
- (g) inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4;
- (h) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro*;
- (i) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ e/o inducción de apoptosis de células tumorales de CXCR4⁺ *in vivo*;
- (j) inhibición de metástasis de células tumorales de CXCR4⁺; y / o
- (k) aumento del tiempo de supervivencia de un sujeto portador de un tumor CXCR4⁺.

Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se une al CXCR4 humano con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une al CXCR4 humano con una K_D de 2×10^{-8} M o menos, se une al CXCR4 humano con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, se une al CXCR4 humano con una K_D de 4×10^{-9} M o menos, se une al CXCR4 humano con una K_D de 3×10^{-9} M o menos, o se une al CXCR4 humano con una K_D de 2×10^{-9} M o menos.

Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción inhibe la unión de SDF-1 al CXCR4 humano con una EC_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, más preferiblemente 30 nM o menos, o 15 nM o menos, o 10 nM o menos, o 5 nM o menos, o 3 nM o menos (por ejemplo, una EC_{50} para la inhibición de 28,60 nM o menos, o 12,51 nM o menos, o 2,256 nM o menos).

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

Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción inhibe la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4 humano con una EC_{50} para la inhibición de 50 nM o menos, más preferiblemente 30 nM o menos, o 20 nM o menos, o 15 nM o menos (por ejemplo, 18,99 nM o menos, o 12,44 o menos).

Ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia CXCR4 humano nativo expresados sobre una superficie celular son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, análisis de citometría de flujo usando

una línea celular que expresa de forma natural CXCR4 nativo o que ha sido transfectado para expresar CXCR4 nativo. Los ensayos apropiados se describen en detalle en los Ejemplos. Una línea celular preferida que expresa CXCR4 nativo es la línea de células CEM T. Los ensayos apropiados para la evaluación de la inhibición de la unión de SDF-1, la inhibición de flujo de calcio inducido por SDF-1, inhibición de la migración de células inducida por SDF-1, inhibición de la formación del tubo capilar por HuVECs, inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4 *in vitro* y/o *in vivo*, inhibición de crecimiento de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro* y/o *in vivo*, e/o inhibición de la metástasis de células tumorales CXCR4⁺ también se describen en detalle en los Ejemplos. La afinidad de unión de los anticuerpos también se puede determinar por métodos estándar, tales como por análisis de Scatchard.

Los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción también incluyen porciones de unión a antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región en bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; y (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo.

Estos fragmentos, obtenidos inicialmente a través de la proteólisis con enzimas tales como papaína y pepsina, han sido diseñados posteriormente en fragmentos de unión a antígenos monovalentes y multivalentes. Por ejemplo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un péptido de enlace sintético que les permite ser hechos como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H pares forman moléculas monovalentes conocidas como fragmentos variables de cadena única (scFv). scFv divalentes o bivalentes (di-scFv o bi-scFv) se pueden diseñar mediante la unión de dos scFvs en dentro de una sola cadena de péptido conocido como un tándem scFv que contienen dos regiones V_H y dos V_L. Dímeros de scFv y multímeros superiores también pueden ser creados usando péptidos de enlace de menos de 10 aminoácidos que son demasiado cortos para que las dos regiones variables sean plegadas juntas, lo que obliga a los scFvs a dimerizar y producir diacuerpos o formar otros multímeros. Los diacuerpos se ha mostrado que se unen a su antígeno cognado con mucho mayor afinidad que los scFvs correspondientes, que tienen constantes de disociación de hasta 40 veces inferior a los valores de K_D para los scFvs. Los enlaces muy cortos (aminoácidos ≤3) conducen a la formación de triacuerpos trivalentes o tetracuerpos tetravalentes que exhiben afinidades incluso más altas para sus antígenos que los diacuerpos. Otras variantes incluyen minicuerpos, que son dímeros scFv-C_{H3}, y fragmentos scFv-Fc más grandes (dímeros scFv-C_{H2}C_{H3}), e incluso una CDR aislada puede exhibir la función de unión al antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos se han diseñado usando técnicas recombinantes convencionales conocidas por las personas experimentadas en la técnica, y los fragmentos son seleccionados para la utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Todos los fragmentos diseñados y proteolíticos anteriores de anticuerpos y variantes relacionadas (ver Hollinger et al., 2005; Olafsen et al., 2010, para más detalles) están previstos para ser incluidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo.

Anticuerpos monoclonales F7, F9, DL y E2

Los anticuerpos preferidos de esta descripción son los anticuerpos monoclonales humanos F7 (BMS-936564), F9, DL y E2, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos V_H de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS. 25, 26, 27 y 28, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_L de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS. 29, 30, 31 y 32, respectivamente. Además, las formas alternativas de F7, F9, DL y E2, en las que ciertos residuos de marco variable fueron sustituidos con un residuo de línea germinal, fueron creados y se denominan aquí como F7GL, F9GL, D1GL y E2GL. Las secuencias V_H de aminoácidos de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en las SEQ ID NOS. 41, 42, 43 y 44, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en las SEQ ID NOS. 45, 46, 47 y 48, respectivamente. Otros anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción incluyen anticuerpos que resultan de "mezclar y combinar" diferentes regiones de V_H y V_L, o diferentes CDRs, para crear anticuerpos que se unen específicamente al CXCR4 como se describe en WO 2008/060367.

Por lo tanto, en un aspecto, esta descripción proporciona anticuerpos que comprenden la cadena pesada y la cadena ligera CDR1's, CDR2's y CDR3's de F7, F9, DL o E2, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1's V_H de F7, F9, DL y E2 se muestran en la SEQ ID Nos. 1-4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2's de V_H de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS. 5-8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR3's de V_H de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS. 9-12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1's de V_K de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS. 13-16, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR2's de V_K de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS 17-20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR3's de V_K de F7, F9, DL y E2 se muestran en las SEQ ID NOS 21-24, respectivamente. Las regiones CDR identificadas anteriormente se describieron utilizando el sistema de Kabat (Kabat et al., 1991).

En un aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al CXCR4, preferiblemente CXCR4 humano, y comprende una combinación de regiones V_H y V_L, cada una comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). En modalidades preferidas, el

anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno del mismo comprende:

- (a) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 25 o 41, y la CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 29 o 45;
- (b) los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 26 o 42, y CDRL, CDR2 y CDR3 de los dominios en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 30 o 46;
- (c) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 27 o 43, y CDR1, CDR2 y CDR3 de los dominios en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31 o 47; o
- (d) los dominios dCDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 28 o 44, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 32 o 48.

En otras modalidades preferidas, el anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable CDR2 de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17 o modificaciones conservadoras de los mismos; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO 6 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18 o modificaciones conservadoras de los mismos; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 22;
- (c) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19 o modificaciones conservadoras de los mismos; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 23; o
- (d) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16 o modificaciones conservadoras de los mismos; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20 o modificaciones conservadoras de los mismos; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24.

En modalidades adicionales, el anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno del mismo comprende:

- (a) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 o 41 o modificaciones conservadoras de los mismos, y una región

variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 29 o 45 o modificaciones conservadoras de los mismos;

(b) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26 o 42 o modificaciones conservadoras de los mismos, y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 30 o 46 o modificaciones conservadoras de los mismos;

(c) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 27 o 43 o modificaciones conservadoras de los mismos, y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31 o 47 o modificaciones conservadoras de los mismos; o

(d) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 28 o 44 o modificaciones conservadoras de los mismos, y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en las SEQ ID NOs: 32 o 48 o modificaciones conservadoras de los mismos.

En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-CXCR4 o porción de unión al antígeno del mismo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO:5;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-CXCR4 o porción de unión al antígeno del mismo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10;

(d) una región variable de CDR1 de cadena ligera que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18; y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 22.

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

Esta descripción también proporciona anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos que se unen a la misma región epítipo (en este caso, el mismo o un epítipo de superposición) en CXCR4 humano como cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 de esta descripción (en este caso, anticuerpos que tienen la capacidad de competir en forma cruzada por la unión al CXCR4 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de esta descripción). Preferiblemente, el anticuerpo de referencia para los estudios de competencia cruzada es el anticuerpo monoclonal F7 (BMS-936564) (con secuencias V_H y V_L como se muestra en las SEQ ID NOs: 25 y 29, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal F9 (que tiene las secuencias V_H y V_L como se muestra en las SEQ ID NOs: 26 y 30, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal D1 (que tiene las secuencias V_H y V_L como se muestra en las SEQ ID NOs: 27 y 31, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal E2 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en las SEQ ID NOs: 28 y 32, respectivamente). En consecuencia, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, que compiten en forma cruzada por la unión al CXCR4 humano con un anticuerpo de referencia o porción de unión al antígeno de referencia del mismo, en donde el anticuerpo de referencia o porción del mismo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 29;

(b) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos

consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 30;

(c) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 27 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31; o

(d) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 28 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 32.

En un aspecto preferido, el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 de competencia cruzada comprende una región V_H que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen una secuencia derivada de una secuencia de la línea germinal V_H 3-48 humana como se establece en la SEQ ID NO: 49 y/o una región V_L que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen una secuencia derivada de una secuencia de línea germinal V_K L15 humana como es establecido en la SEQ ID NO: 50.

Los anticuerpos de competencia cruzada se pueden identificar con base en su capacidad de competir en forma cruzada con F7, F9, DL, E2 o cualquier otra referencia del anticuerpo anti-CXCR4 de esta descripción en un ensayo de unión a CXCR4 estándar, por ejemplo, citometría de flujo con células CEM, en donde el anticuerpo de referencia es marcado con FITC y se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión del anticuerpo de referencia marcado con FITC a las células CEM.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porciones de unión al antígeno del mismo, de la presente descripción, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es apropiado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables, anti-oxidantes, portadores acuosos y no acuosos, y/o adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o efectos adversos mínimos.

Para la administración de un anticuerpo anti-CXCR4 humano, la dosificación se encuentra en intervalos desde aproximadamente 0,0001 hasta 100 mg/kg, preferiblemente desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 20 mg/kg, y más preferiblemente desde 0,1 hasta 10 mg/kg, de peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosis pueden ser 0,1, 0,3, 1,3, 5 o 10 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente, 0,3, 1, 3, o 10 mg/kg de peso corporal. El horario de administración es normalmente diseñado para lograr exposiciones que resultan en la ocupación del receptor sostenida con base en las propiedades farmacocinéticas típicas de un anticuerpo. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Considerando que un anticuerpo IgG4 normalmente tiene una vida media de 2-3 semanas, un régimen de dosificación preferido para un anticuerpo anti-CXCR4 de la descripción comprende 0,3-20 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 1-10 mg/kg de peso corporal, a través de administración intravenosa, con el anticuerpo que se administra cada 7 o 14 días en un máximo de ciclos de 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas hasta la respuesta completa o enfermedad progresiva confirmada.

La dosificación y la programación pueden cambiar durante un curso de tratamiento. Por ejemplo, los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-CXCR4 de esta descripción incluyen 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal a través de administración por vía intravenosa (IV), con el anticuerpo que es administrado usando uno de los siguientes regímenes de dosificación: (i) cada 7 día en ciclos de hasta 6 semanas; (ii) cada dos semanas durante un máximo de seis dosis, y después cada tres meses; (iii) cada tres semanas; (iv) 1-10 mg/ g de peso corporal, una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada 2-3 semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanal, mensual, trimestral o anual. Intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ y en algunos métodos aproximadamente 25-300 $\mu\text{g/ml}$.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se

requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguido por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra en intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta en intervalos relativamente cortos a veces es necesario hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

Niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Una composición de la presente divulgación se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando una o más de varios métodos bien conocidos en el arte previo. Como se apreciará por las personas experimentada en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de liberación microencapsulados. Polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por las personas experimentadas en la técnica. Ver, por ejemplo, Robinson (1978).

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en el arte previo. Por ejemplo, en casos preferidos, una composición terapéutica de esta descripción se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes Estadounidenses Nos. 5.399.163, 5.383.851, o 4.941.880. Muchos otros implantes, sistemas de liberación y módulos son conocidos por las personas experimentadas en la técnica.

Usos y Métodos

Los anticuerpos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente descripción tienen numerosas utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos asociados a CXCR4 incluyendo, por ejemplo, métodos para tratar un sujeto afectado con un cáncer que expresa CXCR4 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al CXCR4 expresado en una superficie celular. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos tales como neoplasias hematológicas que están asociadas con, mediadas o moduladas por, la actividad de CXCR4 o implican la vía CXCR4/CXCL12. En estos métodos para tratar un paciente de cáncer, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo pueden administrarse como monoterapia o, alternativamente, pueden administrarse en combinación con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico antineoplásico. Cuando se administran los anticuerpos a CXCR4 en combinación con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o simultáneamente.

CXCR4 se sabe que es expresado en una amplia variedad de tipos de células tumorales y también se sabe que está implicado en la metástasis tumoral. Por otra parte, como un correceptor para la entrada del VIH en las células T, CXCR4 se sabe que está implicado en la infección por VIH. Además, la vía CXCR4/CXCL12 se ha mostrado que están involucradas en condiciones inflamatorias. Aún además, la vía CXCR4/CXCL12 se ha mostrado que está involucrada en angiogénesis o neovascularización. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 (e inmunoconjugados y moléculas biespecíficas) de esta descripción se pueden utilizar en varias situaciones clínicas, incluyendo los siguientes:

A. Cáncer

La sobreexpresión de CXCR4 también ha sido demostrada en aproximadamente 75 % de los cánceres, y en ciertas situaciones una correlación inversa se ha establecido entre la expresión de CXCR4 y el pronóstico o la supervivencia del paciente. Ejemplos no limitantes de tipos de cáncer asociados con la expresión de CXCR4 o la vía CXCR4/CXCL12 incluyen tumores sólidos como los de mama (Müller et al., 2001), de ovario (Scotton et al., 2001), próstata (Taichman et al., 2002), de pulmón de células no pequeñas (Spano et al., 2004), pancreático (Koshiba et al., 2000), colorrectal (Zeelenberg et al., 2003), riñón (Schrader et al., 2002), y cáncer de tiroides (Hwang et al., 2003), carcinoma nasofaríngeo (Wang et al., 2005), melanoma (Scala et al., 2005), carcinoma de células renales (Staller et al., 2003),

neuroblastoma (Geminder et al., 2001), glioblastoma (Rempel et al., 2000), rhabdomyosarcoma (Libura et al., 2002), y osteosarcoma (Laverdiere et al., 2005), así como neoplasias hematológicas tales como leucemia aguda linfoblástica (Crazzolara et al., 2001), leucemia mieloide aguda (Mohle et al., 1998; Rombouts et al., 2004), mieloma múltiple (Alsayed et al., 2007; Azab et al., 2009), leucemia linfóide crónica (Mohle et al., 1999; Burger et al., 1999), leucemia mieloide crónica (Jin et al., 2008), y linfoma de no Hodgkin (Bertolini et al., 2002; Weng et al., 2003).

Además, esta vía está implicada en estimular el proceso metastásico en múltiples neoplasias (Murphy, 2001). En estudios clínicos, CXCR4 se ha asociado con un aumento de la propensión para la metástasis y disminución de la supervivencia y se ha identificado como un indicador de pronóstico para la leucemia mieloide aguda, de mama, colorrectal, de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de ovario y pancreático en el que una mayor expresión de CXCR4 se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Spoo et al., 2007; Hiller et al., 2011; Ottaiano et al., 2006; Spano et al., 2004; Jiang et al., 2006; Marechal et al., 2009).

Células estromales de la médula ósea (BMSCs) secretan CXCL12 y la interacción con CXCR4 es esencial para migración y mantenimiento de las células madre hematopoyéticas en el microambiente BM (Mohle et al., 1998). Las células leucémicas expresan altos niveles de CXCR4, y la vía desempeña un papel fundamental en la migración de células leucémicas en la BM que a su vez, apoya su crecimiento y supervivencia. CXCR4 es esencial para la diseminación metastásica a órganos tales como BM en donde CXCL12 es expresado. Colectivamente, CXCR4 juega un papel importante tanto en la migración y la retención de las células madre hematopoyéticas en la BM y un antagonista de CXCR4 moviliza las células madre en el torrente sanguíneo, como se ha demostrado con el antagonista de CXCR4 de molécula pequeña, AMD3100 (plerixafor; Mozobil) que fue aprobado por la FDA para su uso en combinación con las colonias de granulocitos que estimulan el factor para trasplantes autólogos en pacientes con NHL y MM (Dar et al., 2011). Otro inhibidor de CXCR4, AMD3465, ha mostrado antagonizar la quimiotaxis inducida por estroma y CXCL12 y la activación inducida por CXCL12 inhibida de las vías de señalización de supervivencia en células leucémicas (Zeng et al., 2009). Además, se demostró que AMD3465, solo o en combinación con el factor estimulante de colonias de granulocitos, movilización inducida de células de AML y células progenitoras en circulación y los efectos antileucémicos mejorados de la quimioterapia y sorafenib, resulta en una marcada reducción de carga de leucemia y supervivencia prolongada de los animales (Zeng et al., 2009). Tales hallazgos sugieren que la interrupción de las interacciones CXCR4/CXCL12 se puede usar para sensibilizar las células leucémicas a la quimioterapia apuntando su microambiente de protección de la médula ósea.

Tal como se describe en los ejemplos, se han desarrollado nuevos anticuerpos terapéuticos monoclonales humanos primeros en su clase dirigidos a CXCR4. Estos anticuerpos monoclonales se unen a las células que expresan CXCR4 con baja afinidad nanomolar, bloque CXCL12 que se une a células que expresan CXCR4 e inhiben la migración inducida por CXCL12 y el flujo de calcio con valores nanomolares EC₅₀ bajos. De manera significativa, además de bloquear el flujo de calcio inducido por CXCL12 y migración, los datos proporcionados en los ejemplos también indican que la inducción dependiente de anticuerpos de la apoptosis de las células tumorales que expresan CXCR4 es un mecanismo de acción de estos anticuerpos anti-CXCR4 humanos. La apoptosis inducida por anticuerpos resultó en eficacia robusta *in vivo* a través de varios modelos de xenoinjertos de tumores hematopoyéticos. Con base en la base de la acción de antagonistas de CXCR4 de molécula pequeña en el aumento de la movilización de células tumorales CXCR4⁺ de la BM y así aumentar la quimiosensibilización, pero no matando directamente tales células tumorales, la eficacia de los presentes anticuerpos anti-CXCR4 en la eliminación de las células cancerosas fue sorprendente e inesperada.

Debido a que CXCR4 juega un papel en múltiples aspectos fundamentales de cáncer, incluyendo la proliferación, migración/invasión y angiogénesis, un antagonista tiene potencialmente múltiples medios para intervenir en neoplasias en donde se expresa CXCR4. Para empezar a diseccionar la vía, los anticuerpos monoclonales totalmente humanos dirigidos contra CXCR4 y CXCL12, respectivamente, se desarrollaron. Tanto los anticuerpos anti-CXCL12 y anti-CXCR4 e inhiben la unión a CXCR4 resulta en la inhibición de respuestas celulares inducidas por ligandos tales como el flujo de calcio y migración (Ejemplos 4-6). Además de estas funciones, el eje CXCR4/CXCL12 ha sido implicado en la promoción de la angiogénesis (Guleng et al., 2005; Ping et al., 2011). Tanto anticuerpos anti-CXCR4 (Ejemplo 7) y anti-CXCL12 (datos no mostrados) también inhibieron la formación de tubo endotelial, una demostración *in vitro* de angiogénesis.

Para investigar los efectos de la interrupción de las interacciones CXCR4/CXCL12, la eficacia de los anticuerpos en atenuar el crecimiento del tumor fue probada en diversos modelos de xenoinjerto *in vivo*. En un modelo para el NHL (linfoma de Burkitt), las células Ramos se injertaron en ratones SCID y rituximab se utilizó como control positivo. Sorprendentemente, el anticuerpo anti-CXCL12 no controló el crecimiento del tumor y pareció indistinguible del vehículo y el control de isotipo. En contraste, el anticuerpo anti-CXCR4 BMS-936564 demostró el control casi completo del crecimiento del tumor con actividad similar como rituximab (Ejemplo 14). Debido a que el bloqueo *in vitro* de la quimiotaxis fue similar entre los dos anticuerpos (Ejemplo 6), es poco probable que el control anti-tumor sea dependiente del bloqueo del eje CXCL12/CXCR4. En consecuencia, un efecto citotóxico directo de BMS-936564 se probó en un ensayo de proliferación de células Ramos. CXCL12 ha sido implicado como un factor autocrino que promueve el crecimiento celular y en un estudio separado CXCL12 ARNsi inhibió el crecimiento de BR5-1 (Liu et al., 2011; Righi et al., 2011). Aunque la inhibición del crecimiento fue parcial, se observó una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación con anti-CXCR4, mientras que AMD3100 y el anticuerpo anti-CXCL12 no tuvieron ningún

efecto (Ejemplo 8). Recientemente, un polipéptido de 14 residuos reportado que es un antagonista de CXCR4 específico (BKT140) ha mostrado que inhibe la proliferación de células de mieloma múltiple (Beider et al., 2011). Se ha sugerido que AMD3100 es un agonista parcial débil mientras que BKT140 actúa como un agonista inverso (Zhang et al., 2002).

En vista de lo anterior, los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción se pueden utilizar en un método para tratar un sujeto afectado con un cáncer que expresa CXCR4 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado en la superficie de una célula de cáncer. El método de tratamiento puede usarse profilácticamente en un sujeto que padecía previamente de, o un sujeto que está en riesgo de contraer un cáncer. En modalidades preferidas, el sujeto es un ser humano y el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un receptor CXCR4 humano. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une al receptor CXCR4 inhibe la actividad del receptor. Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento del mismo interrumpe la migración y mantenimiento de las células madre hematopoyéticas en el microambiente de BM y/o aumenta la movilización de las células de la BM a la periferia, y por lo tanto aumenta la sensibilidad de las células cancerosas hematopoyéticas a los agentes quimioterapéuticos. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo induce la apoptosis de una célula que expresa CXCR4. La apoptosis de las células cancerosas diana permite el uso del anticuerpo como monoterapia.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado, o humano o un fragmento del mismo. En modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humano o un fragmento del mismo. En otras modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 25, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 29.

En ciertas modalidades, de acuerdo con una delineación de las secuencias de CDR por el sistema de Kabat, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo comprende una región variable de CDR1 de cadena pesada que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 5, una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 9, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 13, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 17, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, la secuencia de la que se establece en la SEQ ID NO: 21.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo comprende una región de cadena pesada variable que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 29. En modalidades preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo es un anticuerpo IgG1 o IgG4 o un fragmento del mismo. En modalidades más preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo es BMS-936564 o un fragmento de unión a CXCR4 de los mismos.

Cánceres susceptibles de los métodos de tratamiento descrito en el presente documento incluyen tumores sólidos y neoplasias hematológicas. El tumor sólido puede seleccionarse de mama, de ovario, de próstata, de pulmón de células no pequeñas, de páncreas, de tiroides, colorrectal, y cáncer de riñón, carcinoma nasofaríngeo, melanoma, carcinoma de células renales, neuroblastoma, glioblastoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma. La neoplasia hematológica es seleccionada del mieloma múltiple, linfoma mieloide agudo, linfomas de no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma difuso de células B, linfoma de Burkitt, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma de células anaplásicas grandes, y linfoma linfoblástico de precursores T. Preferiblemente, la neoplasia hematológica es mieloma múltiple, linfoma de no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma mieloide agudo, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica.

Mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas caracterizada por la acumulación de células de plasma, que secretan inmunoglobulina, malignas, dentro de la médula ósea, que puede conducir a la destrucción ósea, insuficiencia de la médula, insuficiencia renal, y neuropatía periférica. La supervivencia media después de los tratamientos convencionales es 3-4 años y se puede ampliar a 5-7 años con un tratamiento de dosis alta seguida de trasplante de células madre hematopoyética autóloga (TPH) (Raab et al., 2009).

Regímenes aprobados actualmente de uso común para MM incluyen regímenes basados en melfalán para inducción y bortezomib o fármacos inmunomoduladores (VELCADE®) o (IMiDs) incluyendo regímenes basados en talidomida o lenalidomida (REVLIMID®) para inducción y para sujetos en recaídas. Para sujetos con MM recurrente o refractario, las opciones de tratamiento incluyen HSCT, repetición de régimen de tratamiento de quimioterapia previo, o un nuevo régimen. HSCT es asociado con un alto riesgo de morbilidad relacionada con el tratamiento. Además, algunos sujetos

no son elegibles para HSCT debido al pobre estado funcional o comorbilidades. Actualmente no existe una cura y las terapias actuales solamente pueden frenar la progresión de la enfermedad, prolongar la supervivencia y minimizar los síntomas. Casi todos los sujetos con MM que sobreviven a su recaída de terapia inicial o se vuelven refractarias, independientemente de la línea de terapia, y requieren terapia adicional (Jemal et al., 2005). Por lo tanto, no hay necesidad médica no satisfecha para los sujetos con MM. En un ejemplo preferido de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la neoplasia hematológica es mieloma múltiple, incluyendo MM recurrente o refractario.

La leucemia mieloide aguda (AML) es la leucemia aguda más común en los adultos, que representan el 80 % de los casos. Más de 13.000 pacientes en los EE.UU. son diagnosticados con AML al año, con más de 8.820 muertes (Cancer Facts and Figures 2008). El tratamiento para AML en adultos incluye quimioterapia de inducción para lograr la remisión y la quimioterapia de la post-remisión (con o sin trasplante de células madre) para evitar una recaída. Las tasas de inducción de remisión se encuentran en el intervalo desde 50 % a 85 %. La enfermedad se repite en la mayoría de los sujetos. El tratamiento de la AML recurrente se asocia con tasas de remisión relativamente bajas con pocos pacientes que derivan en beneficios duraderos (Breems et al., 2005).

Las opciones actuales para tratar adultos con AML recurrente o refractaria son la quimioterapia y HSCT. HSCT alogénico es considerado el tratamiento de elección para falla de inducción primaria o más allá de la primera remisión completa (CR, por sus siglas en inglés) y resulta en la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo en solamente un 20 % de los pacientes. Sin embargo, HSCT no es apropiado o disponible para un gran número de pacientes por diversas razones (por ejemplo, la recaída precoz, falta de acceso al centro de trasplantes). Esto, junto con el hecho de que los pacientes que han sufrido una recaída o son refractarios a la quimioterapia convencional tienen peor pronóstico y responden a la quimioterapia en comparación con aquellos con leucemia aguda recién diagnosticada, requiere que agentes dirigidos, nuevos, necesiten ser desarrollados para esta población de pacientes. En un ejemplo preferido de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la neoplasia hematológica es leucemia mieloide aguda, incluyendo AML recurrente.

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es la leucemia más frecuente en los países occidentales y representa el 30 % de todas las leucemias en los EE.UU. Aproximadamente 14.570 nuevos casos de CLL serán diagnosticados en 2011 (Siegel et al., 2011), y 4.400 pacientes morirán. La enfermedad se caracteriza por una progresión de linfocitos funcionalmente incompetentes, monoclonales, que conducen a linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, y una linfocitosis prominente en la sangre periférica y la médula ósea. La mayoría de los pacientes con CLL inicialmente demuestran una remisión completa o parcial a la quimioterapia, pero con excepción de aquellos tratados por HSCT, casi todos recaen después de la suspensión del tratamiento o desarrollo de enfermedad refractaria. El tratamiento inicial actual para CLL incluye quimioterapia convencional y/o terapia de anticuerpos monoclonal (rituximab). La supervivencia de la mayoría de los pacientes es de 5 a 10 años con aumento de morbilidad en el tiempo. Para los pacientes con CLL recurrente/refractaria, las opciones de tratamiento actuales no curan la enfermedad y existe un estimado de supervivencia media de 16 meses. En un ejemplo preferido de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la neoplasia hematológica es leucemia linfocítica crónica, incluyendo CLL recurrente.

El linfoma folicular (FL) es el segundo linfoma más común en los Estados Unidos y Europa Occidental, que representa aproximadamente 20 % de NHL (total), y la mayoría de los linfomas de bajo grado. A pesar del hecho de que la mayoría de los pacientes responden a la terapia inicial (con aproximadamente 40-80 % de remisión completa), dependiendo del régimen utilizado, casi todos los pacientes desarrollan más tarde la enfermedad progresiva. Además, hasta el 10 % son refractarios a su tratamiento inicial. Por lo tanto, se necesitan nuevas terapias más eficaces. En un ejemplo preferido de los métodos de tratamiento actuales, la neoplasia hematológica es el linfoma folicular, incluyendo FL recurrente.

Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) es el tipo más común de NHL, que representan el 25-30 % de los casos de adultos (40 % de NHL en los pacientes de más de 75 años de edad). DLBCL tiene varios subtipos, incluyendo pero no limitado a centro germinal tipo B (GCB, por sus siglas en inglés), tipo células B activadas (ABC, por sus siglas en inglés) y mediastínico primario (Gisselbrecht et al, 2011). La supervivencia global de 3 años (OS, por sus siglas en inglés) para GCB y ABC en los pacientes tratados es 84 % y 56 %, respectivamente. La mayoría de los pacientes con DLBCL no se curan con la terapia convencional. Después de una recaída, aunque por lo menos 60 % de los pacientes siguen siendo sensibles al tratamiento convencional, menos del 10 % han prolongado la supervivencia libre de la enfermedad con regímenes de tratamiento de segunda línea (Gisselbrecht et al, 2010). DLBCL recurrente o refractaria (r/r) se trata con quimioterapia (con o sin rituximab) con el objetivo de la quimioterapia de alta dosis y trasplante posterior, para el subconjunto de pacientes con enfermedad sensible a la quimioterapia. Aproximadamente el 50 % de los que respondieron a un segundo régimen de quimioterapia seguida de HSCT mantienen su respuesta en 2 años. Para los candidatos no trasplantados a quienes falla la terapia de segunda línea o que recaen después del trasplante, la terapia es paliativa. Sin trasplante, la quimioterapia proporciona un control de la enfermedad a corto plazo en r/r DLBCL. Pacientes refractarios primarios son poco probables de lograr CR con un segundo régimen de quimioterapia y después de una recaída, por lo general una segunda remisión no es duradera (Singer et al, 1986). Puesto que DLBCL es inicialmente una enfermedad que responde a la quimioterapia, la adición de un agente tal como un anticuerpo anti-CXCR4 de esta descripción para restaurar la quimiosensibilidad es una buena estrategia para el tratamiento de esta enfermedad. En un ejemplo preferido de los métodos de tratamiento descritos en el presente

documento, la neoplasia hematológica es linfoma difuso de células grandes B, incluyendo DLBCL recurrente o refractario.

Impulsados por los datos de los estudios de VIH-1 que muestran que la apoptosis mediada por CXCR4 mediante la unión de glicoproteína-gp120 de la envoltura del VIH-1 al CXCR4 (Garg et al., 2006; Berndt et al., 1998), se midió la capacidad de un anticuerpo anti-CXCR4 de la descripción, BMS-936564, para inducir la apoptosis de líneas celulares que expresan CXCR4. La apoptosis inducida por BMS-936564 se demostró en más de 20 diferentes líneas celulares que expresan CXCR4 (ver el Ejemplo 11, y las Tablas 3 y 4), lo que confirma que este mecanismo no se limita a un tipo de célula.

La apoptosis también se demostró en un modelo *in vitro* de la enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés) para leucemia linfocítica crónica (Kashyap et al., 2012). La erradicación de la MRD es uno de los objetivos más difíciles de tratamiento de CLL. En este modelo de MRD, que se basa en el cocultivo de células estromales que expresan y secretan CXCL12 y ofrecen un apoyo de supervivencia a las células de leucemia primarias de pacientes con CLL, las células de CLL exhibieron mayor viabilidad (20-60 % en 48 horas) y mostraron resistencia a los agentes de quimioterapia. Sin embargo, las concentraciones nanomolares (2-200nm) de BMS-936564 inducidas por la muerte celular en células de CLL cultivadas solas, así como las incubadas utilizando el modelo de MRD. La actividad proapoptótica de BMS-936564 parece ser independiente de P53 puesto que se observó apoptosis en células de CLL de pacientes con la delección de 17p y resistencia a fludarabina *in vitro*. BMS-936564 también inhibió la polimerización de F-actina mediada por CXCL12 en células de CLL a concentraciones más bajas que con AMD-3100, un inhibidor de CXCR4 de molécula pequeña. Estos datos sugieren que el BMS-936564 puede orientar eficazmente las células de CLL presentes en el microambiente del tumor *in vivo* que pueden contribuir a la MRD (Kashyap et al., 2012).

El efecto apoptótico de los anticuerpos anti-CXCR4 descritos, una propiedad no exhibida por antagonistas de CXCR4 de molécula pequeña, por ejemplo, AMD3100, indica que estos anticuerpos pueden utilizarse solos, como monoterapia, para el tratamiento de pacientes con cáncer. Estudios previos sobre el efecto de los antagonistas de CXCR4 en modelos en tumores de MM y AML *in vivo* han sugerido que estos antagonistas son eficaces en la mejora de la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia (Azab et al., 2009; Zeng et al., 2009). En contraste, los datos presentados aquí en los Ejemplos demuestran que una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa se logra cuando se administra BMS-936564 como monoterapia en una amplia variedad de modelos de AML, NHL y MM. Por lo tanto, en ciertas modalidades, el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo se administra como monoterapia. En modalidades preferidas, el anticuerpo o fragmento del mismo induce la apoptosis de una célula que expresa CXCR4. En consecuencia, esta descripción proporciona un método para inducir la apoptosis de las células de cáncer que expresan CXCR4, incluyendo las células de la mayoría de las displasias hematológicas, que comprende administrar a un sujeto afectado con cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado en una superficie celular.

Puesto que BMS-936564 es un anticuerpo IgG₄, la eficacia *in vivo* no puede ser explicada por la ADCC o CDC. Sin embargo, es posible que el anticuerpo, una vez unido a las células que expresan CXCR4, acople receptores FcγR1 expresados en células que presentan antígeno que conducen a la fagocitosis. Las líneas celulares, en las que la eficacia BMS-936564 se observó *in vivo*, requieren un anticuerpo anti-Fc secundario a BMS-936564 para inducir la apoptosis *in vitro* (Ejemplo 11). Esto puede ser una consecuencia de una menor expresión de CXCR4 en las determinadas líneas celulares. Si el mecanismo de iniciación de la apoptosis depende de llevar moléculas CXCR4 en estrecha proximidad, y la densidad de CXCR4 en la superficie celular es baja con respecto a la distancia de unión abarcada por el anticuerpo anti-CXCR4, a continuación, un anticuerpo anti-Fc de alta afinidad secundaria puede ser necesario para cerrar esa brecha, llevando los receptores juntos para conducir una señal apoptótica. *In vivo*, esto se puede lograr a través de receptores FcγR1.

Los datos descritos en este documento sugieren un nuevo mecanismo de acción, que implica la apoptosis de las células diana que expresan CXCR4, para un anticuerpo anti-CXCR4 además de su papel en la movilización celular. Estos datos indican que BMS-936564 puede proporcionar una terapia eficaz para las neoplasias hematológicas incluyendo MM, AML, y diversos NHL, tales como FL y DLBCL, así como para las neoplasias de tumor sólido. Sin embargo, los presentes procedimientos no están necesariamente limitados a ningún mecanismo particular de acción de los anticuerpos anti-CXCR4 de la descripción. Por ejemplo, CXCR4 puede modular la transición epitelial a mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) en células de MM y los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción pueden inhibir la EMT, como se evidencia por la demostración de que BMS-936564 inhibe las proteínas Twist, Snail y Slug relacionadas con EMT, y sobreexpresa la E-cadherina (Roccaro et al., 2012). Estos datos corroboran la opinión de que CXCR4 puede representar un objetivo terapéutico válido debido a su capacidad para modular la EMT.

Previamente se ha mostrado que el eje CXCR4/CXCL12 juega un papel importante en migración y el tráfico de células de MM a la BM, y la interrupción de la interacción de las células tumorales con la BM conduce a una mayor sensibilidad a los agentes terapéuticos (Alsayed et al., 2007; Azab et al., 2009). Estos hallazgos sugieren que el anticuerpo anti-CXCR4 humano, BMS936564, puede prevenir la migración y la adhesión de las células de MM a la BM y sensibilizar estas células a los agentes terapéuticos. En particular, la validez de esta base para la orientación de CXCR4 se fundamenta en los datos *in vivo* reportados por Roccaro et al. (2012) que utilizaron células de MM primario (CD138⁺), líneas celulares de MM (MM. 1S, RPMI.8226), y células estromales de médula ósea de MM primario (BMSCs) para

evaluar la migración hacia CXCL12 y BMSCs. La síntesis de la citotoxicidad y ADN se midieron por la captación de MTT y timidina, respectivamente. Un modelo de melanoma de ratón *in vivo* se utilizó para validar el efecto de anticuerpos anti-CXC4 en la modulación de metástasis de células tumorales. Se demostró que (1) ratones tratados con BMS-936564 presentaron una menor difusión celular de MM a nichos de médula ósea distante, en comparación con los ratones tratados con vehículo, que soportan la hipótesis de que el CXCR4 puede representar una modulación fundamental de difusión de células tumorales; (2) en el modelo de xenoinjerto de melanoma de ratones tratados con BMS-936564 mostraron una reducción del número de metástasis en comparación con los ratones tratados con vehículo; y (3) BMS-936564 funcionalmente se dirigen a las células de MM *in vitro* en términos de migración, adhesión y supervivencia (Roccaro et al., 2012).

Se demostró además que BMS936564 inhibió la migración de las células de MM hacia CXCL12 y BMSCs de MM primaria de una manera dependiente de la dosis. La adhesión de las células de MM primaria a BMSCs también se inhibió por BMS936564 de una manera dependiente de la dosis, mientras que también la inducción de la citotoxicidad en células CD138⁺ derivadas de MM primaria. El anticuerpo BMS936564 dirigido a células de MM en el contexto del entorno de BM mediante la superación de la proliferación inducida por BMSC de las células tumorales. Además, BMS936564 sinérgicamente mejoró la citotoxicidad inducida por bortezomib en células de MM (Roccaro et al., 2012). Como se ha descrito en el Ejemplo 11, la activación dependiente de BMS936564 de las vías apoptóticas en células de MM se demostró mediante la escisión de la caspasa-9 y PARP. Las fosforilaciones de ERK, Akt, y Src inducidas por CXCL12 fueron inhibidas por BMS936564 de una manera dependiente de la dosis. Es importante destacar que, tal como se describe en el Ejemplo 16, BMS936564 inhibió la proliferación de células de MM *in vivo* en modelos de xenoinjerto de ratón.

En total, estos datos demuestran claramente que la orientación de CXCR-4 en las células de MM con un anticuerpo anti-CXCR4 proporciona un medio eficaz, probablemente que emplea múltiples mecanismos, para el tratamiento de cáncer en general, y MM en particular.

Los anticuerpos anti-CXCR4 de la descripción también se pueden utilizar en combinación de otros tratamientos contra el cáncer, tal como cirugía y/o radiación, y / o pueden ser co-administrados con uno u más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-CXCR4. El anticuerpo puede estar relacionado con el agente (como un inmunoconjugado) o se puede administrar por separado desde el agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o se puede coadministrar con otros agentes terapéuticos conocidos, incluyendo fármacos quimioterapéuticos convencionales y anticuerpos que se unen a antígenos asociados a tumores o dianas inmunoregulatoras. Los fármacos quimioterapéuticos incluyen, entre otros, doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida, lenalidomida, bortezomib, dexametasona, mitoxantrona, etopósido, citarabina, bendamustina, rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido. La coadministración de un anticuerpo anti-CXCR4, o fragmento de unión de antígeno del mismo, de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anti-cáncer que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico a las células tumorales humanas. Tal coadministración puede resolver los problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los volverían no reactivos con el anticuerpo.

En otras modalidades, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o la actividad de Fcγ o receptores Fcγ, por ejemplo, tratar al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), interferón-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

Los anticuerpos de esta descripción también se pueden utilizar en combinación con uno o más anticuerpos terapéuticos adicionales u otros agentes de unión, tales como proteínas de fusión de Ig. Ejemplos no limitantes de otros anticuerpos o agentes de unión con los que un anticuerpo anti-CXCR4 de esta descripción se puede administrar en combinación incluyen anticuerpos o agentes de unión a CTLA-4, PSMA, CD30, IP-10, IFN-γ, CD70, PD-1, PD-L1, KIR, TNF, TNF-R, VEGF, VEGF-R, CCR5, IL-1, IL-18, IL-18R, CD19, CD52, CS1, EGFR, CD33, CD20, Her-2, CD25, GPIIb/IIIa, IgE, CD11a, integrina α4, IFNα e IFNAR1.

Hay una creciente evidencia de que la interrupción de la vía de CXCR4, y la interrupción de la interacción entre las células cancerosas hematológicas tales como las células de MM y su microambiente de la médula ósea, confiere una mayor sensibilización a las terapias contra el cáncer, tales como con lenalidomida y bortezomib para MM. Tal como se describe en los ejemplos, los datos no clínicos sobre el BMS-936564 como monoterapia y en combinación con quimioterapia en líneas celulares de MM y los estudios de xenoinjertos indican que BMS-936564 está activo en MM y puede mejorar la eficacia de los regímenes, como la lenalidomida/dexametasona y bortezomib. Los estudios preclínicos también han mostrado que la inhibición de CXCR4 con AMD3100 conduce a desadhesión de las células de MM a partir de células estromales de médula ósea y la movilización de estas células en la periferia, lo que resulta en aumento de sensibilidad al bortezomib (Azab et al., 2009). Los anticuerpos anti-CXCR4 de la descripción potencian de manera similar el efecto de agentes quimioterapéuticos por su capacidad para liberar las células malignas desde

el entorno de protección de la BM. Además de la movilización de las células de MM y el aumento de su quimiosensibilización, estos anticuerpos tienen el efecto adicional de matar directamente las células de MM por apoptosis (Ejemplo 11), entre otros mecanismos posibles. BMS-936564 se ha mostrado que inhibe el crecimiento del tumor de MM *in vivo* cuando se administra solo o en combinación con lenalidomida o bortezomib (Ejemplo 16).

En ciertas modalidades, el uso médico reivindicado es para un método que comprende además administrar al sujeto por lo menos un agente quimioterapéutico en combinación con el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo. En ciertas modalidades, el por lo menos un agente quimioterapéutico es lenalidomida más dexametasona en dosis bajas, o bortezomib y dexametasona. Estas combinaciones de quimioterapia son los regímenes estándar que han demostrado su valor terapéutico en pacientes con MM recurrente o refractario, y el perfil de seguridad de estos agentes de quimioterapia está bien caracterizado. En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 es administrado semanalmente, en el Ciclo 1 para las dos primeras semanas como monoterapia y, después en combinación con un régimen de quimioterapia que incluye lenalidomida más dexametasona en dosis bajas, o bortezomib y dexametasona.

Por ejemplo, para el tratamiento de MM con BMS-936564 en combinación con lenalidomida y dexametasona, un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende: (1) BMS-936564 (1, 3, o 10 mg/kg) administrado como una sola infusión IV de 60 minutos en los días 1, 8, 15, 22, 29 y 36 (Ciclo 1) y en los días 1, 8, 15, y 22 (Ciclo 2 y siguientes ciclos); (2) lenalidomida (25 mg por vía oral), administrada durante 21 días (días 15-35; Ciclo 1) y los días 1-21 (Ciclo 2 y siguientes ciclos); y (3) dexametasona (40 mg) administrada en los días 15, 22, 29, y 36 (Ciclo 1) y en los días 1, 8, 15, y 22 (Ciclo 2 y ciclos posteriores).

Para el tratamiento de MM con BMS-936564 en combinación con bortezomib y dexametasona, un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende: (1) BMS-936564 (1, 3, o 10 mg/kg) se administra como una sola infusión IV de 60 minutos en los días 1, 8, 15, 22, y 29 (Ciclo 1) y en los días 1, 8 y 15 (Ciclo 2 y siguientes ciclos); (2) Bortezomib (1,3 mg/m²) administrado como un bolo IV de 3-5 segundos en los días 15, 18, 22 y 25 (Ciclo 1) y en los días 1, 4, 8, 11 (ciclo 2 y ciclos posterior); y (3) dexametasona (20 mg) administrada en los días 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25 y 26 (Ciclo 1) y en los días 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 y 12 (Ciclo 2 y siguientes ciclos).

En ciertos métodos terapéuticos descritos en el presente documento, el cáncer es AML y por lo menos un agente quimioterapéutico administrado a un paciente con cáncer en combinación con el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo de la descripción es mitoxantrona, etopósido, y/o citarabina, puesto que este régimen es considerado un régimen de atención estándar para los pacientes con AML, reincidente y refractario (Amadori et al., 1991). En ciertos ejemplos preferidos, el anticuerpo anti-CXCR4 se administra semanalmente, en el Ciclo 1 para las dos primeras semanas como monoterapia, y después en combinación con un régimen de quimioterapia que incluye mitoxantrona, etopósido, y citarabina.

Por ejemplo, para el tratamiento de AML con BMS-936564 como monoterapia, un régimen a modo de ejemplo comprende BMS-936564 (0,3, 1, 3, o 10 mg/kg) administrado como una sola infusión IV de 60 minutos en el Día 1 en el Ciclo 1, y en los días 1, 8 y 15 en ciclos posteriores.

Para el tratamiento de AML con BMS-936564 en combinación con quimioterapia, un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende: (1) BMS-936564 administrado el primer día de la quimioterapia antes de la primera dosis de la quimioterapia. BMS-936564 se administra en los días 1, 8 y 15 en el Ciclo 2 y siguientes ciclos. Además, para los ciclos 2-13, la quimioterapia consiste en el siguiente régimen (ciclo de 28 días): (2) mitoxantrona (8 mg/m² IV) durante 15 minutos en el Día 1 hasta 5; (3) etopósido (100 mg/m² IV) durante 1 hora en el Día 1 hasta 5; y (4) citarabina (Ara-C; 1 g/m² IV) durante 1 hora en el Día 1 hasta 5.

En ciertos métodos terapéuticos descritos en el presente documento, el cáncer es CLL o FL y por lo menos un agente quimioterapéutico administrado a un paciente con cáncer en combinación con el anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo de la descripción es bendamustina y/o rituximab. Los estudios preclínicos indican que hay una sinergia antitumoral entre bendamustina y rituximab en varias líneas celulares de leucemia y linfoma (Rummel et al., 2002) de tal manera que estos últimos linfomas de células B sensibilizados a la apoptosis inducida por quimioterapia, incluyen bendamustina (Chow et al., 2002). La combinación de bendamustina más rituximab (BR) han mostrado eficacia en pacientes con linfoma que no han sido tratados previamente, pretratados o refractarios a rituximab (Friedberg et al., 2008). En ciertos ejemplos preferidos, el anticuerpo anti-CXCR4 es administra en combinación con bendamustina y rituximab.

En ejemplos preferidos de un método para tratar DLBCL, el anticuerpo anti-CXCR4 se utiliza en combinación con rituximab, ifosfamida, carboplatino, y/o etopósido (Kewalramani et al., 2004). Ningún régimen de quimioterapia ha mostrado superioridad en DLBCL recurrente o refractario. R-ICE (rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido) es uno de los regímenes más comúnmente usados en r/r DLBCL debido a su eficacia comparable a otros regímenes y la disminución de la toxicidad en relación con R-DHAP (dexametasona, citarabina en dosis alta, cisplatino) seguido de quimioterapia de dosis altas y HSCT autólogo para los pacientes que respondieron (Gisselbrecht et al., 2010). En ciertos ejemplos preferidos, el anticuerpo anti-CXCR4 se administra en combinación con rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido.

Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos de FL, DLBCL y CLL con BMS-936564 como monoterapia, un régimen preferido comprende BMS-936564 (0,3-10 mg/kg) administrado como una sola infusión IV de 60 minutos en el día 1 en el Ciclo 1, y en los días 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50 en ciclos posteriores.

5 Cuando se administra en combinación con quimioterapia para el tratamiento de sujetos de CLL, FL, y DLBCL, una modalidad a modo de ejemplo comprende la administración de BMS-936564 en el primer día de la quimioterapia antes de la primera dosis de la quimioterapia, y administración de la quimioterapia por lo menos 1 hora después de la finalización de la infusión de BMS-936564. BMS-936564 se administra en los días 1 y 8 en el ciclo 2 y ciclos posteriores.

10 La quimioterapia para CLL consiste del siguiente régimen (ciclo de 28 días): rituximab (375 mg/m² IV) en el día 1 del ciclo 2 y ciclos posteriores, después 500 mg/m² el día 1 de los ciclos posteriores; y bendamustina (70 mg/m² IV) durante 60 minutos en el día 1 del ciclo 2.

15 La quimioterapia para FL consiste en el siguiente régimen (ciclo de 28 días): rituximab (375 mg/m² IV) en el día 1 del ciclo 2 y ciclos posteriores, después 500 mg/m² el día 1 de los siguientes ciclos; y bendamustina (90 mg/m² IV) durante 60 minutos en el día 1 del ciclo 2.

20 La quimioterapia para DLBCL consiste del siguiente régimen (ciclo de 28 días): rituximab (375 mg/m² IV) en el día 1 del ciclo 2 y ciclos posteriores; ifosfamida (5000 mg/m²) en infusión continua IV, el día 4, junto con Mesna (sulfonato de 2-mercaptoetano Na; 5000 mg/m²) en infusión continua IV durante 24 horas, a partir del día 4 del Ciclo 2 y ciclos posteriores; carboplatino (dosis para producir un AUC objetivo de 5 mg/ml·min calculado por la fórmula de Calvert; dosis máxima = 800 mg), en el día 4 del ciclo 2 y ciclos posteriores; etopósido (100 mg/m² IV) al día los días 3-5 del ciclo 2 y los ciclos posteriores.

25 Un aspecto de esta descripción es el uso de cualquier anticuerpo anti-CXCR4 o porción de unión al antígeno del mismo de la descripción para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto afectado con un cáncer de CXCR4⁺. Usos de cualquier anticuerpo anti-CXCR4 o porción de unión al antígeno del mismo de la descripción para la preparación de medicamentos son ampliamente aplicables a toda la gama de los cánceres descritos en este documento. En ejemplos preferidos de estos usos, los cánceres incluyen las hemoplasias hematológicas, tal como
30 mieloma múltiple recurrente o refractario, linfoma mieloide agudo recurrente, leucemia linfocítica crónica refractaria, linfoma folicular recurrente o linfoma difuso de células B refractarias. Esta descripción también proporciona usos médicos de cualquier anticuerpo anti-CXCR4 o porción de unión al antígeno del mismo de la descripción correspondiente a todos los métodos de tratamiento que emplean un anticuerpo anti-CXCR4 se describe en el presente documento.

35 También dentro del alcance de la presente descripción hay kits que comprenden cualquier anticuerpo anti-CXCR4 de fragmento de unión al antígeno o composición del mismo de esta descripción y las instrucciones para su uso. En consecuencia, esta descripción proporciona un kit para tratar un cáncer en un sujeto, el kit comprende (a) una o más dosis de cualquiera de los anticuerpos anti-CXCR4 o fragmento de unión a CXCR4 del mismo de la descripción y (b)
40 instrucciones para el uso del anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento del mismo en cualquiera de los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CXCR4 en el kit comprende los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 29. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CXCR4 es BMS-
45 936564. El kit puede contener además uno o más reactivos terapéuticos adicionales tal como se describe en el presente documento, tal como un reactivo inmunosupresor, un agente quimioterapéutico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales que se dirigen a diferentes antígenos.

50 Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el destino de los contenidos del kit y las instrucciones para su uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado suministrado en o con el kit, o que de otra manera acompaña al kit. En ciertos ejemplos de un kit farmacéutico, el anticuerpo anti-CXCR4 puede ser coempaquetado con otros agentes terapéuticos en forma de dosificación unitaria.

55 *B. Infecciones virales, incluyendo infección por VIH*

CXCR4 se ha mostrado que es un correceptor para la entrada del VIH en las células T y, además, ciertos anticuerpos anti-CXCR4 de murino se ha demostrado que son capaces de inhibir la entrada de aislados de VIH en las células T (ver Hou et al., 1998; Carnec et al., 2005). Por lo tanto, el CXCR4 se puede utilizar como un receptor por virus para la
60 entrada en la célula y anticuerpos para que CXCR4 se pueda usar para inhibir la entrada en la célula de tales virus que usan CXCR4 como un receptor. CXCR4 mediado por apoptosis mediante la unión de glicoproteína de la envoltura gp120 del VIH-1 al CXCR4 se ha reportado (Garg et al., 2006).

La investigación reveló que los anticuerpos reticulados al CXCR4 podían imitar la muerte celular observada con inducción de gp120 (Berndt et al., 1998), que sugirió que el uso de anticuerpos del receptor de anti-quimioquinas para
65 prevenir la infección de VIH-1 puede resultar en destrucción eficiente y rápida de las células T que expresan el receptor. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 humanos de esta descripción se pueden utilizar para inhibir la entrada de un

virus en una célula, en donde el virus utiliza CXCR4 como un receptor para la entrada de células, de tal manera que se inhibe la infección viral. En particular, los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir la entrada del VIH en las células T, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de VIH/SIDA. El anticuerpo puede ser utilizado solo o en combinación con otros agentes antivirales, tales como fármacos antiretrovirales tales como AZT o inhibidores de proteasa.

C. Condiciones Inflamatorias

La vía CXCR4/CXCL12 se ha mostrado que desempeña un papel en varias condiciones inflamatorias, incluyendo pero no limitado a enfermedad hepática inflamatoria (Terada et al, 2003); inflamación de las articulaciones autoinmune (Matthys et al., 2001); enfermedad de las vías respiratorias alérgicas (Gonzalo et al, 2000); y enfermedad periodontal (Hosokawa et al., 2005).

Por lo tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 humanos de esta descripción que inhiben la unión de CXCL12 para CXCR4 se pueden utilizar para inhibir la inflamación en trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos seleccionados del grupo que consiste de enfermedad inflamatoria del hígado, inflamación de las articulaciones autoinmune, enfermedad de las vías respiratorias alérgicas, enfermedad periodontal, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo I, trastornos inflamatorios de la piel (por ejemplo, psoriasis, liquen plano), enfermedad tiroidea autoinmune, síndrome de Sjögren, inflamación pulmonar (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sarcoidosis pulmonar, alveolitis linfocítica) y enfermedad inflamatoria del riñón (por ejemplo, nefropatía por IgA, glomerulonefritis). El anticuerpo puede ser utilizado solo o en combinación con otros agentes anti-inflamatorios, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs, por sus siglas en inglés), corticosteroides (por ejemplo, prednisona, hidrocortisona), metotrexato, inhibidores de COX-2, antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept, infliximab, adalimumab) e inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, azatioprina y ciclosporina A).

D. Angiogénesis

Se ha demostrado que CXCL12 induce neovascularización través del reclutamiento de hemangiocitos que expresan CXCR4 (Jin et al., 2006). Por otra parte, el bloqueo de la vía de CXCR4/CXCL12 puede atenuar el crecimiento del tumor *in vivo* mediante la inhibición de la angiogénesis en una manera independiente de VEGF (Guleng et al., 2005). Aún además, como se demuestra en el Ejemplo 7, los anticuerpos de esta descripción son capaces de inhibir la formación de tubos capilares *in vitro*. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción que inhiben la unión de CXCL12 a CXCR4 se pueden utilizar para inhibir la angiogénesis al interferir con la vía de CXCR4/CXCL12. La inhibición de la angiogénesis se puede utilizar, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o la metástasis tumoral (independientemente de si el tumor es CXCR4⁺). El anticuerpo puede ser utilizado solo o en combinación con otros agentes anti-angiogénicos, tales como anticuerpos anti-VEGF.

E. Trasplante autólogo de células madre

Las células madre de sangre periférica son la fuente preferida de células madre para su uso en el trasplante autólogo de células madre, por ejemplo en el tratamiento de ciertas neoplasias hematológicas. La colección de células madre de la sangre periférica requiere la movilización de células madre CD34⁺ de la BM a la sangre periférica. Varias citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión han sido implicadas en la regulación de este proceso (revisado en Gazitt, 2001), incluyendo la interacción de CXCR4 y SDF-1. Por otra parte, un antagonista de CXCR4 de molécula pequeña se ha demostrado que estimula la rápida movilización de células madre CD34⁺ células de la BM a la periferia (ver, por ejemplo, Devine et al., 2004; Broxmeyer et al., 2005; Flomenberg et al., 2005). Por lo tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 de esta descripción que inhiben la actividad de CXCR4 (en este caso, anticuerpos antagonistas) se pueden utilizar para estimular la movilización de células madre CD34⁺ de la BM a la sangre periférica para permitir el uso de tales células madre en el trasplante (por ejemplo, trasplante autólogo), por ejemplo, en el tratamiento de trastornos hematológicos, tales como mieloma múltiple y linfoma de no Hodgkin. El anticuerpo puede ser utilizado solo o en combinación con otros agentes utilizados para estimular la movilización de células madre, tales como G-CSF y/o GM-CSF. Por lo tanto, un método para estimular la movilización de células madre CD34⁺ de la BM a la sangre periférica en un sujeto se describe en el presente documento, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-CXCR4 de esta descripción de tal manera que la movilización de células madre CD34⁺ de la BM a la sangre periférica es estimulada. El método puede comprender además la recolección de células madre CD34⁺ de sangre periférica, tales como para su uso en el trasplante autólogo de células madre.

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

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales humanos contra CXCR4 y CXCL12

Anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 humano se generaron utilizando un acercamiento de combinación en el que, primero, ratones transgénicos transgénicos que expresan genes de anticuerpos humanos (Medarex KM Mouse®, Milpitas, CA, se describe en la publicación PCT No WO 02/43478 y la patente Estadounidense No 7.041.870)

fueron inmunizados con células R1610transfectadas con CXCR4 humano para aumentar en los ratones un repertorio de inmunoglobulinas humanas específicas para CXCR4 humano y, después, en segundo lugar, una biblioteca de anticuerpo humano se preparó a partir de células de bazo de los ratones y se muestra en fago de tal manera que el fago entonces fue tamizado para la expresión de fragmentos de región variable que tienen afinidad por el CXCR4 por cribado con CXCR4 humano incorporado en proteoliposomas magnéticos (CXCR4-MPL). Fragmentos de la región variable de interés se volvieron a clonar en un vector de expresión Fab y Fab se volvió a examinar por la unión del antígeno frente a las células que expresan CXCR4 transfectadas. Clones de Fab F7 (desde MDX-1338 o BMS-936564 redesignados) F9, D1 y E2 fueron seleccionados, para su posterior análisis. Los anticuerpos completos se generaron a partir de los Fabs usando técnicas de biología molecular convencionales. Este acercamiento de combinación se describe generalmente en la patente Estadounidense No 6.794.132, y se describe específicamente en detalle en el documento WO 2008/060367.

Para generar el anticuerpo anti-CXCL12, ratones transgénicos Medarex KM® fueron inmunizados con CXCL12 humano recombinante (Peptotech, Rocky Hill, NJ). Lisados de bazo se agruparon y se procesaron como se describió previamente (patente Estadounidense No 6.794.132). El uso de procedimientos de presentación de fagos de propiedad, Biosite generó fragmentos de anticuerpo (biblioteca Fab). Los fagos que se unieron a CXCL12 fueron seleccionados utilizando CXCL12 biotinada. Los Fabs reactivos con antígeno seleccionados se convirtieron a IgG₄ de longitud completa (S228P) y fueron reexpresados en células CHO.

Anticuerpos de control de isotipo IgG₄ que contienen la mutación bisagra S228P para reducir la formación de la mitad de anticuerpo (Angal et al., 1993) fueron producidos en Biologics Discovery California, Sunnyvale, CA).

Ejemplo 2

Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 humano F7, F9, D1 y E2

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los clones de Fab F7, F9, D1 y E2, obtenidas a partir de la selección de la biblioteca de expresión en fago como se describe en el Ejemplo 1, se secuenciaron usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de F7 se muestran en la Figura 1A y en las SEQ ID NOs: 33 y 25, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de F7 se muestran en la Figura 1B y en las SEQ ID NOs: 37 y 29, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada F7 con respecto a las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada F7 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Un análisis más detallado de la secuencia de F7 V_H usando el sistema de Kabat de la determinación de región CDR llevó a la delimitación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en la Figura 1A y en las SEQ ID NOs: 1, 5 y 9, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera F7 con respecto a las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera F7 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Un análisis adicional de la secuencia de F7 V_L utilizando el sistema de Kabat de la determinación región CDR llevó a la delimitación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en la Figura 1B y en las SEQ ID NOs: 13, 17 y 21, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de F9 se muestran en las SEQ ID NOs: 34 y 26, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de la región variable de F9 se muestran en las SECs ID NOs: 38 y 30, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada F9 con respecto a las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada F9 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Un análisis adicional de la secuencia de F9 V_H usando el sistema de Kabat de la determinación de región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 2, 6 y 10, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera F9 con respecto a las secuencias conocidas de inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera F9 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana L15 V_K y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Un análisis adicional de la secuencia de F9 V_L utilizando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOs: 14, 18 y 22, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de D1 se muestran en las SEQ ID NO: 35 y 27, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de D1 se muestran en las SECs ID NOs: 39 y 31, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada D1 con respecto a las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de D1 utiliza un segmento V_H de la

línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23, y un segmento JH de línea germinal humana JH 6B. Un análisis adicional de la secuencia V_H de D1 usando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs. 3, 7 y 11, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de D1 con respecto a las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de D1 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Un análisis adicional de la secuencia V_L de D1 utilizando el sistema de Kabat de la determinación región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOs. 15, 19 y 23, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada E2 se muestran en las SEQ ID NOs: 36 y 28, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera E2 se muestran en las SECs ID NOs: 40 y 32, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada E2 con respecto a las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada E2 utiliza un segmento V_H de la línea germinal humana V_H 3-48, un segmento D de la línea germinal humana 4-23, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. Un análisis adicional de la secuencia E2 V_H usando el sistema de Kabat de la determinación región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 4, 8 y 12, respectivamente. La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera E2 con respecto a las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena ligera E2 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana V_K L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK 1. Un análisis adicional de la secuencia de E2 V_L utilizando el sistema de Kabat de la determinación de la región CDR llevó a la delimitación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOs: 16, 20 y 24, respectivamente.

Análisis de las secuencias de marco variable de las regiones V_H y V_L de F7, F9, D1 y E2, en comparación con las secuencias de la línea germinal de la que se derivaron, identificaron varios residuos variables de aminoácidos que diferían de la línea germinal. Ciertos residuos variables en las regiones N-terminal de los segmentos V_H y V_L fueron elegidos para "mutación reversiva" para restaurar los residuos variables a la secuencia de la línea germinal, ya que estos residuos no de la línea germinal en la porción N-terminal fueron codificados por los cebadores utilizados para crear las bibliotecas de expresión en fago descritas en el Ejemplo 1. En particular, las formas modificadas de los segmentos V_H y V_L de F7, F9, D1 y E2 (referidos como formas "GL", para la línea germinal) fueron creadas usando técnicas estándar de biología molecular para sustituir el residuo de aminoácidos de la línea germinal en la posición variable indicada. Los aminoácidos específicamente mutados reversivos, y las alineaciones de las secuencias de las variantes de GL con las secuencias de las regiones variables originales de F7, F9, DL y E2 se proporcionan en el documento WO 2008/060367.

Los fragmentos Fab F7, F9, DL y E2 son convertidos a anticuerpos de longitud completa utilizando técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN que codifica las regiones V_H y V_K de uno de los fragmentos Fab se puede clonar en un vector de expresión que lleva las regiones constantes de cadena pesada y ligera de tal modo que las regiones variables están unidas operativamente a las regiones constantes. Alternativamente, vectores separados se pueden utilizar para la expresión de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión apropiados para su uso en la creación de anticuerpos de longitud completa incluyen los vectores pIE descritos en la Patente Estadounidense NO 7.674.618. Los fragmentos Fab F7 (BMS-936564) se convirtieron en un anticuerpo IgG 4 de longitud completa (S228P) y fueron re-expresados en células CHO.

Ejemplo 3

Características de unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-CXCR4

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

La línea de células T humanas CEM, que expresa CXCR4 humana nativa en su superficie celular, se utilizó para examinar la capacidad de los anticuerpos F7, F9, D1 y E2 para unirse a la superficie celular nativa CXCR4. F7, F9, D1 y E2 de longitud completa se titularon en una serie de diluciones en serie 1: 3, lo que resulta en un intervalo de concentración de 300 nM hasta 5 pM. Los anticuerpos se mezclaron entonces con células CEM y se permitieron unir antes de ser detectados con un anticuerpo secundario IgG anti-humano conjugado con FITC. Las células fueron analizadas por citometría de fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia medias resultantes se muestran en la gráfica de la Figura 2, que demuestra que todos los cuatro anticuerpos anti-CXCR4 se unen a células CEM. La EC_{50} para unir F7, F9, D1 y E2 fueron 21 nM, 14 nM, 80 nM y 290 nM, respectivamente.

Para determinar la capacidad de un panel de anticuerpos anti-CXCR4 para competir por la unión a CXCR4, se realizaron estudios de competición. Se utilizaron los cuatro anticuerpos anti-CXCR4 humanos F9, F7, E2 y D1, junto con cuatro anticuerpos anti-CXCR4 monoclonales de murino disponibles en el comercio (12G5, 708, 716 y 717; R & D Systems catalog Nos. MAB 170, MAB171, MAB172 y MAB173, respectivamente). Los anticuerpos anti-CXCR4 se

titularon en una serie de dilución en serie 1:3 que resulta en un intervalo de concentración de 300 nM hasta 5 pM en la presencia de una concentración constante de anticuerpo anti-CXCR4 marcado con FITC F9. La mezcla de anticuerpos después se agregó a las células CEM y se permitió que se uniera. La capacidad de cada anticuerpo para competir con F9 para la unión a células CEM se evaluó por citometría fluorescente y detección de FITC. Las intensidades fluorescentes medias resultantes se muestran en la gráfica de la figura 3, que muestra que todos los siete anticuerpos examinados (F7, E2, DL, 12G5, 708, 716 y 717) fueron capaces de competir con F9 para unirse a las células CEM, aunque el anticuerpo E2 solo demostró una inhibición parcial a concentraciones altas en comparación con los otros anticuerpos.

En otro conjunto de experimentos, la capacidad del BMS-936564 mAb para unirse a varias diferentes líneas celulares se examinó por citometría de flujo realizando una titulación de FACS. Cantidades crecientes de mAb (de menos de 0,001 µg/ml a más de 100 µg/ml) se incubaron con 100,000 células y la unión evaluó por citometría de flujo. El valor Bmax también fue determinado, lo que indica aproximadamente cuántas moléculas CXCR4 están presentes en cada célula. Con base en las curvas de unión, se determinó una EC₅₀ para la unión del anticuerpo, los resultados de los cuales se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de Titulación FACS para la unión de F7 (BMS-936564) a diferentes líneas celulares

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

Los resultados muestran que el mAb F7 (BMS-936564) es capaz de unirse eficazmente a cada una de las seis líneas celulares sometidas a prueba, con las EC₅₀'s más bajas observadas con las líneas de células Ramos y Raji. Estos datos también muestran que la expresión del receptor CXCR4 es más alta para las células Ramos y Namalwa y más baja para células MDA-MB-231 y células DMS79.

En otro experimento de unión, se examinó la capacidad del mAb BMS-936564 para unirse a diferentes subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). PBMCs humanas fueron aisladas por métodos estándar y diferentes subconjuntos celulares se aislaron por FACS. En particular, se aislaron los siguientes subconjuntos celulares: (i) CD3⁺, (ii) CD20⁺, (iii) CD11b⁺ y (iv) CD14⁺. Los experimentos de citometría de flujo llevados a cabo con el mAb BMS-936564 (a 33 µg/ml) demostraron que era capaz de unirse eficazmente a cada uno de los cuatro subconjuntos, en comparación con un anticuerpo de control de isotipo coincidente.

En otro experimento, un conjunto diferente de líneas celulares CXCR4⁺ humanas se evaluaron para la unión de BMS-936564 usando citometría de flujo. Las células se prepararon para tinción de citometría de flujo (FACS) mediante la suspensión de las células con las concentraciones indicadas de BMS-936564 puro o BMS-936564 biotinilado antes de la incubación de la mezcla de anticuerpos y las células con estreptavidina conjugada con FcY-PE o PE anti-humano de cabra. Las células se analizaron mediante FACS, regulando la población de células vivas identificadas por FSC y SSC. La unión dependiente de la dosis se observó que las líneas celulares R1610-huCXCR4 (fibroblastos de hámster R1610transfectadas con CXCR4 humano y mantenidos bajo la selección G418); Ramos (linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos); CEM (leucemia linfoblástica aguda de linfoblastos T humanos); Nomo-1 (leucemia mieloide aguda humana); HL-60 (promieloblastos humanos); MOLP8 (MM humano); y JJ-3R (línea celular de MM humano seleccionado por su resistencia a bortezumib). Ver la Figura 4. No se detectó ninguna unión a las células parentales R1610. Con base en la intensidad de fluorescencia media geométrica (GMFI), los niveles de CXCR4 fueron más altos en las células R1610-huCXCR4 y Ramos seguida por CEM (Figura 4B), Nomo-1 y HL60 (Figuras 4A-4D). Las líneas celulares de mieloma múltiples MOLP-8 y JJN-3R expresaron el menor número de receptores (Figura 4C). Los valores de EC₅₀ para la unión se muestran en la Tabla 2. Además, BMS-936564 unido a PBMC de donadores sanos (datos no mostrados), así como 7/8 de muestras de PBMCs obtenidas de pacientes con AML con GMFI variables (Figura 4D). Estos datos indican que CXCR4 se expresa en múltiples líneas celulares hematopoyéticas y de forma variable expresadas en pacientes con AML.

Tabla 2: Unión de BMS-936564 a líneas celulares CXCR4⁺ humanas

Tipo de célula	EC ₅₀ (nM)
R1610-huCXCR4	2,3
Ramos	4,2
CEM	10,3

Nomo-1	40
HL-60	5,3
MOLP-8	6,5
JJN-3R	2,0

Ejemplo 4

Inhibición de la unión de CXCL12 a CXCR4 por anticuerpos Anti-CXCR4 y anti-CXCL12

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la unión de CXCL12 a CXCR4, se realizó un estudio de competencia utilizando CXCL12 marcado con ^{125}I (PerkinElmer, Waltham, MA) y las células CEM, que naturalmente expresan CXCR4. Una comparación de los anticuerpos anti-CXCR4 en el bloqueo de la unión de CXCL12 a células CEM se realizó mediante un ensayo de unión estándar de ligando radio-marcado. Los anticuerpos anti-CXCR4 se diluyeron en serie 1:3 para producir un intervalo de concentraciones de 300 nM a 137 pM. Los anticuerpos se agregaron a 750,000 células de CEM en 100 μl en la presencia de 100 pM de CXCL12 marcado con ^{125}I con una actividad específica de 2000 Ci/mmoles (Amersham, catálogo # IM314-25UCI). Un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo se usó como un control negativo. El ligando radio-marcado unido total posible se determinó al permitir que el CXCL12 marcado don ^{125}I se una a las células CEM en la ausencia de anticuerpos durante 2 horas a 4°C. La unión no específica del ligando radiomarcado se determinó al permitir que el ^{125}I -CXCL12 se una en la presencia de 1 μM de CXCL12 sin marcar (Peprotech, catálogo# 300-28A). La cantidad de células asociadas a ^{125}I -CXCL12 se determinó por métodos estándar. Los resultados se muestran en la Figura 5, que demuestra que el anticuerpo F7 (BMS-936564) proporciona el bloqueo más eficaz de unión de CXCL12 a CXCR4 expresado en células CEM. Los anticuerpos F9 y D1 también bloquearon la unión CXCL12, aunque más moderadamente que F7. El anticuerpo E2, aunque no se une a CXCR4 en células CEM (como se demuestra en el Ejemplo 3), no bloqueó efectivamente la unión de CXCL12 a CXCR4 en células CEM. Las EC_{50} 's para el bloqueo de CXCL12 por F7, F9 y D1 fueron 2,3 nM, 12,5 nM y 28,6 nM, respectivamente.

En otro experimento, el bloqueo de la unión de CXCL12 a CXCR4 mediante BMS-936564 y un anticuerpo anti-CXCL12. Diluciones seriales de BMS-936564, anti-CXCL12 y el anticuerpo de control se probaron para el bloqueo de la unión de ^{125}I -CXCL12 a las células CEM CXCR4⁺. La competencia de ^{125}I -CXCL12 (PerkinElmer, Waltham, MA) que se une a CXCR4 en las células CEM se demostró utilizando una concentración fija de ^{125}I -CXCL12 (100 pM) y una titulación de BMS-936564 desde 5 pM hasta 300 nM. Un anticuerpo isotipo se usó como un control negativo y CXCL12 no marcado se utilizó como control positivo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, los filtros se lavaron, se retiraron y los conteos por minuto (CPM) fueron leídos por un contador gamma PerkinElmer Wizard® (Waltham, MA). Para todos los estudios *in vitro*, los datos se graficaron y analizaron con el software GraphPad Prism (San Diego, CA), usando regresión no lineal y las curvas de dosis-respuesta sigmoidales.

Se llevaron a cabo estudios de unión de saturación utilizando CXCL12 radiomarcado y células CEM CXCR4^{hi}. El K_D de la unión ^{125}I -CXCL12 a células CEM se determinó que era 4,3 nM (datos no mostrados) que es similar al K_D reportado de CXCL12 para CXCR4 que se encuentra en el intervalo desde 3,0 hasta 5,4 nM (DiSalvo et al., 2000). Usando una concentración fija subóptima de ^{125}I -CXCL12 (100 pM), BMS-936564 se tituló y la inhibición dependiente de la dosis de la unión de ^{125}I -CXCL12 con un valor de EC_{50} de aproximadamente 2 nM fue observado (Figura 6A). Resulta interesante, que el anticuerpo anti-CXCL12 fue más potente e indujo una inhibición dependiente de la dosis de la unión de ^{125}I -CXCL12 a células CEM con un valor de EC_{50} de aproximadamente 90 pM (Figura 6B).

BMS-936564 también se muestra que bloquea la unión de ^{125}I -CXCL12 a células Ramos en una forma dependiente de la dosis con un valor de EC_{50} de aproximadamente 11 nM (Figura 6C).

Ejemplo 5

Inhibición de flujo de calcio inducido por CXCL12 por anticuerpos anti-CXCR4 y anti-CXCL12

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir el flujo de calcio en las células CEM inducidas por CXCL12, las células CEM se marcaron primero con el colorante fluorescente de calcio 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los anticuerpos anti-CXCR4 se titularon en una serie de dilución en serie 1:3 que resulta en un intervalo de concentración de 100 nM a 1 pM y se les permitió unirse a 200,000 células CEM en 200 μl y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente antes de cargarse en una máquina FlexStation® (Molecular Devices). Como control negativo, se utilizó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. Las células fueron estimuladas con una concentración final de 50 nM de CXCL12 α humana recombinante (Peprotech), se agregaron como 500 nM en un volumen de 22 μl para un volumen final de 222 μl . El flujo de calcio resultante fue medido durante 200 segundos por pozo. Como control positivo, las células en la ausencia de anticuerpo se estimularon con CXCL12 α (compuestos en solución salina amortiguada de Hank (HBS) con 0,1 % de BSA o HBS) para lograr una señal de flujo de calcio máxima posible. Para determinar una línea base, se estimularon las células con HBS con 0,1 % de BSA. La liberación estimulada con CXCL12 α de calcio se midió mediante el desarrollo de la fluorescencia dependiente de calcio a través

del tiempo. El área bajo la curva de la traza de fluorescencia resultante se reportó como una indicación de flujo de calcio. La inhibición resultante de flujo de calcio por los anticuerpos anti-CXCR4 se representa en la Figura 7. Los datos se representaron gráficamente y las EC_{50} s se calcularon utilizando el software GraphPad Prism y la fórmula dosis-respuesta sigmoidea de ajuste de curva no lineal. Los anticuerpos F7 (BMS-936564), F9 y D1 inhibieron el flujo de calcio inducido por CXCL12 α . Aunque el anticuerpo E2 se unió a CXCR4 (como se demuestra en el Ejemplo 3), no inhibió significativamente el flujo de calcio inducido por CXCL12 α . Las EC_{50} s para la inhibición del flujo de calcio inducido por CXCL12 mediante F7, F9 y D1 fueron de 0,90 nM, 0,2 nM y 0,57 nM, respectivamente.

En otro experimento, se comparó la capacidad de BMS-936564 y anti-CXCL12 para inhibir flujo de calcio inducido por CXCL12. Las células Ramos y CEM se cargaron con colorante de calcio 4 FLIPR® (Molecular Devices), y una concentración fija de CXCL12 se utilizó para estimular el flujo de calcio. Una titulación de BMS-936564 o anti-CXCL12 desde 50 pM hasta 100 nM se utilizó para inhibir la respuesta. Una respuesta de calcio máxima se fijó con menos anticuerpos CXCL12. Una respuesta de referencia se estableció con la estimulación de solución amortiguadora de las células sin CXCL12. Los flujos de calcio se leyeron en el FlexStation® (Molecular Devices). CXCL12 se mostró un aumento dependiente de la dosis en calcio intracelular con el flujo de calcio pico alcanzado a 50 nM y 5 nM con células Ramos y CEM, respectivamente. Utilizando la concentración óptima de CXCL12 para estimular el flujo de calcio, se utilizó una titulación de BMS-936564 o anti-CXCL12 para inhibir la respuesta (Figuras 6C y 6D). Tanto BMS-936564 y anti-CXCL12 bloquearon el flujo de calcio inducido por CXCL12 de una manera dependiente de la dosis. BMS-936564 se bloqueó con una EC_{50} de aproximadamente 10 nM y 8 nM en Ramos y CEM, respectivamente (Figuras 8A y 8B), mientras que anti-CXCL12 se bloqueó con una EC_{50} de células de aproximadamente 35 nM (Ramos) y 2 nM (CEM) (Figuras 8A y 8B).

Ejemplo 6

Inhibición de la migración inducida por CXCL12 de células CEM por anticuerpos anti-CXCR4 y anti-CXCL12

Para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la migración de células CEM inducidas por CXCL12, células CEM primero se marcaron con el reactivo de migración quimioluminiscente BATDA (bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato) (PerkinElmer). Los anticuerpos anti-CXCR4 se titularon en una serie de dilución en serie 1:3 que resulta en un intervalo de concentración de 100 nM a 1 pM y se les permitió unirse a las células CEM marcadas a una densidad de 10 millones de células por ml. Como un control negativo, se utilizó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. CXCL12 α humano recombinante (Peprotech) se agregó a 5 nM a 30 μ l por pozo a la cámara inferior de una placa de migración Neuroprobe de 96 pozos con filtros de 5,7 mm de diámetro por pozo. Cada pozo contiene poros de 5 μ m. Células CEM marcadas con y sin anticuerpo se cargaron en los filtros a una concentración de 0,5 millones de células por pozo en un volumen de 50 μ l. La placa de migración se incubó a 37°C durante 2,5 horas. Células migradas fueron capturadas en la cámara inferior de la placa, se lisaron y se detectaron con una solución de detección Europium DELFIA® (Perkin Elmer). La señal quimioluminiscente se registró en un instrumento de fusión. La inhibición resultante de la migración inducida por CXCL12 α por los anticuerpos anti-CXCR4 se muestra en la Figura 9. Los resultados demostraron que los anticuerpos F7 y F9 inhibieron eficazmente la migración, mientras que los anticuerpos D1 y E2 no inhibieron significativamente la migración. Las EC_{50} s para la inhibición de la migración de células CEM inducidas por CXCL12 F7 y F9 fueron 12,44 nM y 18,99 nM, respectivamente.

En otro experimento, se comparó la capacidad de BMS-936564 y anti-CXCL12 para inhibir la migración inducida por CXCL12 de células Ramos y CEM. Las células se cargaron con BATDA. Una concentración fija de CXCL12 se utilizó para estimular la migración de células a través de un filtro que contiene poros de 5 μ m en placas de migración de Neuro Probe (Gaithersburg, MD). Una titulación de BMS-936564 o anti-CXCL12 desde 20 pM hasta 300 nM se agregó a las células. Se utilizó CXCL12 sin anticuerpo para establecer la migración máxima. La migración hacia el medio solo, sin CXCL12 se utilizó para medir la migración del antecedente. Después de una incubación de 2 horas a 37°C, las células migradas se detectaron mediante la adición de solución de DELFIA® Europium (Perkin Elmer) a las células lisadas y se detectaron por el tiempo de fluorescencia resuelto en el instrumento de fusión. La concentración óptima de CXCL12 para inducir la migración Ramos se estableció que era 10 ng/ml (1,25 nM) mientras que las células CEM fueron más sensibles a CXCL12 y exhibieron la migración máxima a 0,05 nM de CXCL12. BMS-936564 se muestra que bloquea la migración inducida por CXCL12 con un valor de EC_{50} aproximado de 1 nM en células Ramos y 4 nM en células CEM (Figuras 10A y 10B). Anti-CXCL12 inhibió la migración inducida por CXCL12 con un valor de EC_{50} aproximado de células de 0,9 nM (Ramos) y 0,13 nm (CEM) (Figuras 10A y 10B).

Ejemplo 7

Inhibición de la Formación de Tubo Capilar HuVEC de Anticuerpos Anti-CXCR4

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la formación de tubos capilares por las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). MATRIGEL® se diluyó 1:1 con medio RPMI y se colocaron en placas en los pozos de una placa de 96 pozos y se dejaron polimerizar durante 30 minutos a 37°C. HUVEC (de Cambrex, # cat. CC-2519) en 80 % de confluencia se tripsinizaron y se resuspendieron en 1×10^5 células por ml en RPMI con 0,5 % de FBS. Los anticuerpos se mezclaron bien con HuVEC a una concentración final de 3

µg/ml y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo o medio solo se utilizó como control negativo. Como control positivo de la inhibición de la formación de tubos, se utilizó un anticuerpo αvβ3 anti-humano de ratón (CD51/CD61) de (R & D Systems, # cat. MAB3050). HuVEC con o sin anticuerpos se colocaron en placas en los pozos recubiertos con MATRIGEL® y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Las HuVEC incubadas con medio solo o con el anticuerpo de control de isotipo coincidente formó tubos capilares que resultan en la aparición de células conectadas a través de la placa con 3-5 puntos de conexión o puntos de ramificación por célula. Las HuVEC incubadas con cualquiera de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 o el anticuerpo anti-AvP3 no formó tubos capilares. Las células parecían aisladas y con pocos o ningún punto de ramificación. Los anticuerpos anti-CXCR4 que eran más eficaces en el bloqueo de la unión de CXCL12, el flujo de calcio inducido por CXCL12 y la migración inducida por CXCL12, es decir, F7 y F9, también eran los más eficaces en inhibir la formación del tubo capilar. El anticuerpo anti-CXCR4 E2, que se une al CXCR4 pero no bloquea la unión de CXCL12 o los efectos inducidos por CXCL12, no inhibió la formación del tubo capilar.

Ejemplo 8

Los anticuerpos anti-CXCR4, pero no anti-CXCL12, inhiben la proliferación in vitro de células que expresan CXCR4

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la proliferación de células tumorales Ramos (una línea celular humana de linfoma de Burkitt) *in vitro*. En el ensayo, 1×10^4 células/pozo se incubaron con dosis incrementadas (10^{-3} a 300 nM) de anticuerpo IgG4 F7, anticuerpo IgG1 F9, anticuerpo IgG1 E2, anticuerpo Fab' F9 o controles de isotipo. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 72 horas, con ^3H -timidina que se agrega para las 24 horas finales de incubación para permitir el monitoreo de la proliferación celular. Después de la incubación, la incorporación de ^3H -timidina por las células se midió mediante técnicas estándar. Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 11A. Los resultados demuestran que los anticuerpos IgG4 F7, IgG1 F9 y IgG1 E2 cada uno es capaz de inhibir la proliferación de células Ramos, como se indica por una disminución de ^3H -timidina cuando se incubó con estos anticuerpos, mientras que el fragmento Fab' F9 no inhibió la proliferación celular. Estos resultados indican que los anticuerpos humanos anti-CXCR4 tienen un efecto anti-proliferativo directo en las células tumorales *in vitro* y por lo tanto no requieren reticulación secundaria para lograr un efecto anti-proliferativo.

En otro experimento, se compararon los efectos de MDX-1338, anti-CXCL12, y antagonistas CXCR4 de molécula pequeña, AMD3100 y BKT140, en la proliferación de células Ramos. Las células Ramos se suspendieron en 1×10^5 células/ml en medio de crecimiento, se incubaron con los anticuerpos pertinentes, incluidos los controles de isotipo, y otros agentes de prueba y se cultivaron durante 72 horas a 37°C. Cell-Titer-Glo (Promega) se agregó a los pozos, se mezcló, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La placa se leyó en un luminómetro Glomax (Promega). Los resultados se muestran en la Figura 11B. Un máximo de aproximadamente 50 % de inhibición de la proliferación de células Ramos fue vista con tratamiento de 40 nM de BMS-936564 en comparación con control de isotipo, pero anti-CXCL12 no inhibió la proliferación celular. Además, AMD3100, un antagonista CXCR4 de pequeña molécula no inhibió la proliferación. Un antagonista péptido de 14 residuos descrito recientemente, BKT140, inhibió la proliferación, pero en concentraciones mucho más altas (100 µM). La camptotecina (CPT) inhibió completamente la proliferación celular en 10 µM.

Ejemplo 9

Inhibición de la proliferación celular de tumor sólido in vivo por anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo, se examinó la capacidad de los anticuerpos humanos anti-CXCR4 para inhibir la proliferación de un tumor sólido establecido *in vivo* utilizando un modelo de célula tumoral subcutánea Ramos. En este ensayo, 10×10^6 de células Ramos/ratón se implantaron en la región del flanco de cada ratón y se dejaron crecer hasta un tamaño medio de 40 mm³, calculado por la longitud x ancho x altura/2 de los tumores. Los ratones recibieron entonces una inyección intraperitoneal (IP) de una primera dosis de anticuerpo (designado como día 0 de tratamiento) y recibieron una segunda dosis de IP del anticuerpo en el día 7. Los ratones tratados con un anticuerpo del fragmento Fab' también recibieron dosis de anticuerpos IP en el día 3 y día 10. Grupos de ratones (n = 8) se trataron con (i) vehículo; (ii) control de isotipo (15 mg/kg); (iii) IgG4 F7 (15 mg/kg); (iv) IgG1 F9 (15 mg/kg); (v) Fab' F9 (10 mg/kg); o (vi) control positivo anti-CD20 (15 mg/kg). El volumen del tumor y el peso corporal del ratón se midieron en intervalos regulares (aproximadamente 2-3 veces/semana) entre el día 0 y el día 30 después de la dosificación. Los resultados del experimento se presentaron en las Figuras 12A, 12B y 12C, que muestran volumen del tumor promedio (Figura 12A), mediana del volumen del tumor (Figura 12B) y % de cambio de peso corporal mediano (Figura 12C). Los resultados demostraron que, al igual que el control positivo, los anticuerpos IgG4 F7 y IgG1 F9 inhibieron significativamente el crecimiento de células tumorales tal como se mide por el aumento de volumen del tumor, mientras que el fragmento Fab' de F9 no inhibió el crecimiento de células tumorales en comparación con el control de isotipo. Todos los tratamientos fueron bien tolerados como se indica mediante ningún cambio significativo de peso corporal. Las diferencias en el peso corporal entre los tratamientos eran muy probables debido a los pesos de los tumores. Los resultados indican que los anticuerpos humanos anti-CXCR4 son capaces de inhibir el crecimiento de un tumor sólido

establecido *in vivo*.

Ejemplo 10

- 5 *Tiempo de supervivencia incrementado en un modelo sistémico de células tumorales de ratón por el tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, pero no con un anticuerpo anti-CXCL12*

En este ejemplo, se examinó la capacidad de un anticuerpo humano anti-CXCR4 para aumentar el tiempo de supervivencia de los ratones usando un modelo sistémico de células tumorales Ramos. En este ensayo, 1×10^6 células Ramos/de ratón se inyectaron por vía intravenosa (IV) en cada ratón en el Día 0. Los ratones recibieron entonces una inyección intraperitoneal (IP) de una primera dosis de anticuerpo en el Día 1 (en este caso, un día después de la administración IV de las células tumorales) y recibieron cuatro dosis IP más de anticuerpo, en los días 5, 8, 15 y 22 (ratones tratados con el anticuerpo de control positivo fueron tratados solo en el día 1). Los grupos de ratones ($n = 8$) se trataron con (i) vehículo; (ii) control de isotipo (15 mg/kg); (iii) IgG1 F9 (15 mg/kg); o (iv) control positivo anti-CD19 (15 mg/kg). Los estudios de respuesta de dosis se habían encontrado previamente que 15 mg/kg es una dosis eficaz de anticuerpos anti-CD19 (datos no mostrados). El porcentaje de supervivencia se midió en intervalos regulares entre los días 0 y 50 después de la dosificación (parálisis de patas traseras fue utilizado como el punto final del experimento). Los resultados del experimento se presentan en la Figura 13A, que muestra el porcentaje de supervivencia en el tiempo. La mediana de los números de días de supervivencia de los ratones tratados con vehículo o el control de isotipo fueron 23 y 25,5 días, respectivamente, mientras que la mediana del número de días de supervivencia de los ratones tratados con una dosis del control positivo anti-CD19 fue 39 días. Significativamente, 100 % de los ratones en el grupo tratado con cinco dosis de anticuerpo IgG1 F9 sobrevivieron hasta el final del experimento. Estos resultados indican que el anticuerpo humano anti-CXCR4 es capaz de aumentar los tiempos de supervivencia de los ratones en un modelo de célula de tumor sistémica.

Se realizó un experimento similar para comparar la capacidad de BMS-936564 y el anticuerpo anti-CXCL12 para aumentar el tiempo de supervivencia de los ratones. Ratones SCID con xenoinjertos sistémicos de tumor Ramos fueron tratados con 15 mg/kg de BMS-936564, el anticuerpo anti-CXCL12, el control anti-CD19 positivo, un control de isotipo IgG4 o IgG1 humano, o un control de vehículo (PBS), como se describió anteriormente. BMS-936564 se encontró que era altamente eficaz en la prolongación de la supervivencia del ratón en este modelo sistémico Ramos, mucho más que el control positivo anti-CD19 (ver la Figura 13B). La mediana del número de días de supervivencia de los ratones tratados con el vehículo o los controles de isotipo fueron 23-24 días, mientras que la mediana del número de días de supervivencia de los ratones tratados con una dosis del control positivo anti-CD19 fue 39 días. De manera significativa, al final del experimento 120 días después de la implantación, 100 % de los ratones en el grupo tratado con cinco dosis de BMS-936564 sobrevivieron. En contraste, el anticuerpo anti-CXCL12 sorprendentemente no mostró ninguna eficacia, con tiempos de supervivencia prácticamente idénticos a los de los controles de vehículo e isotipo. Estos datos indican que un mecanismo distinto de, o además de, el bloqueo de los efectos inducidos por CXCL12 debe ser operacional *in vivo*.

Ejemplo 11

BMS-936564 induce apoptosis de células que expresan CXCR4

La fuerte actividad antitumoral *in vivo* de BMS-936564 impulsó nuevos estudios destinados a comprender el mecanismo de acción de BMS-936564. Específicamente, un conjunto de experimentos se centró en la capacidad de los anticuerpos anti-CXCR4 mAb F7 (BMS-936564) para inducir la apoptosis en diferentes líneas celulares. En el ensayo de apoptosis, mAb F7 en 10 g/ml se incubaron con células Ramos (500.00 células), células Namalwa (500.000 células) o células R1610 transfectadas para expresar CXCR4 (100.000 células). Células R1610 no transfectadas se utilizaron como un control negativo. El anticuerpo anti-CXCR4 mAb F7 o isotipo de control se incubó con las células a 37°C y muestras de 250 µl se retiraron a las 24, 48 y 72 horas. Para evaluar la apoptosis, las células de distintos puntos de tiempo se incubaron con anexina V-FITC-FL1 y yoduro de propidio-FL3, seguidas por citometría de flujo. El porcentaje combinado de células recogidas en los cuadrantes doble positivos FL1, FL3 y FL1-FL3 se consideraron apoptóticos. Para eliminar los antecedentes, los porcentajes de células apoptóticas inducidas por anticuerpos de isotipo se restaron del porcentaje de células apoptóticas inducidas por BMS-936564.

Los resultados, que se resumen a continuación en la Tabla 3, demuestran que mAb F7 es capaz de inducir la apoptosis en las células Ramos, Namalwa y R1610-CXCR4 mientras que F7 no tuvo ningún efecto sobre la inducción de la apoptosis de las células R1610 parentales que indican que la respuesta fue específica-CXCR4.

Tabla 3: Inducción de apoptosis por mAb anti-CXCR4 F7

Células	Tiempo (horas)	% Apoptosis
R1610	72	<1
R1610-CXCR4	24	39
R1610-CXCR4	48	58
R1610-CXCR4	72	46

Ramos	24	22
Ramos	48	31
Ramos	72	22
Namalwa	24	17
Namalwa	48	24
Namalwa	72	44
Los valores de % de apoptosis total son corregidos para los cambios de referencia inducidos por anticuerpos de control de isotipo.		

En otro experimento, se examinó la capacidad de BMS-936564 para inducir la apoptosis en una variedad más amplia de líneas de células (véase la Tabla 4). Las células (5×10^5 células/ml) se incubaron con 10 nM-330 nM de BMS-936564 o isotipo de control a 37°C durante 24 horas. Para un subconjunto de células (ver la Tabla 4), se agregó un anticuerpo de reticulación (Ab policlonal específico para Fc de IgG anti-humano de cabra) en exceso de seis veces. Para todos los tipos de células, la camptotecina (CPT), un alcaloide de quinolina citotóxico que inhibe la enzima de ADN topoisomerasa I, se agregó a 10 μ M durante 24 horas a 37°C como un control positivo para la inducción de la apoptosis. Las células se resuspendieron en solución amortiguadora de unión de Anexina V (10 mM de HEPES en pH 7,4, 140 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl_2) y se tiñeron con anexina V-APC y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) o yoduro de propidio (PI). Las células se lavaron, se resuspendieron en solución amortiguadora de unión de Anexina V, y se analizaron por citometría de flujo (FACSArray system, BD Biosciences, San Jose, CA) y el software FlowJo (TreeStar, Inc., San Carlos, CA).

Linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos Ramos (Cat. CRL-1596), leucemia linfoblástica aguda de linfoblastos T humanos CCRF-CEM (CCL-119), promieloblast humano HL-60 (CCL-240), linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos Namalwa (CRL-1432), linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos Raji (CCL-86), RPMI 8226 de mieloma humano (CCL-155), MM de linfoblastos B humanos MM.1S (CRL-2974), mieloma humano U226B1 (TIB-196), leucemia mielomonocítica bifenotípica humana MV-4-11 (CRL-9591), linfoma de células T humanas MJ (CRL-8294), linfoma de células T humanas HH (CRL-2105), linfoma cutáneo de linfoblastos humanos Hut78 (TIB-161), linfoma de no Hodgkin de células NK humanas NK92 (CRL-2407) las líneas celulares se adquirieron de ATCC, Manassas, VA.

Leucemia mieloide aguda humana Nomo-1 (ACC 542), MM MOLP-8 (ACC 569), linfoma de no Hodgkin de células B humanas SU-DHL6 (ACC 572), linfoma de Hodgkin humano L540 (CAC 72), AML humana KG-1 (ACC 14), MM humano MOLP-8 (ACC 569), MM humano OPM-2 (ACC 50), leucemia de células plasmáticas humanas L-363 (ACC 49) las líneas celulares se adquirieron de DSMZ, Braunschweig, Alemania.

Tabla 4: Inducción de apoptosis en un panel de líneas celulares por BMS-936564

Línea celular	Tipo de célula	Expresión CXCR4	Porcentaje de Apoptosis ajustado	% de inhibición de crecimiento de tumor (monoterapia)
Ramos*	Linfoma	++++	71	80
Namalwa*	Linfoma	++++	30	66
Raji*	Linfoma	++++	15	65
DHL6*	Linfoma	+	3	55/77
L540*	Linfoma	+++	35	
HL60	AML	++	31	60/82
Nomo-1	AML	++++	34	88
KG-1	AML	++	8	23
MOLP-8	MM	++	19	66
RPMI 8226	MM	++	17	
MM.1S	MM	+	15	49
U226	MM	+	22	
JJN3R	MM	++	31	97
OPM2	MM	++	17	
L-363	MM	+	16	
MV-4-11	MM	++	1	
MJ	TCL	++	9	
HH	TCL	+++	9	

HuT78	TCL	+	22	
CCRF-CEM*	ALL	+++	45	72
NKL	NK	+++	36	
KHYG-1	NK	+	10	
NK-92	NK	++	48	
Primaria humana*	B (CD19+)	++	17	
Primaria humana*	T (CD3+)	+	6	
Primaria humana*	Monocitos (CD14+)	++	24	
Expresión clave CXCR4				
MFI con 10Nm Ab	Calificación (+)			
400-2000	+			
2000-10.000	++			
10.000-50.000	+++			
50.000-250.000	++++			
* Sin reticulador				

Fibroblastos de hámster R1610 (CRL-1657) adquiridos de ATCC fueron transfectados con CXCR4 humano y se mantuvieron bajo selección usando G418 a 500 mg/ml. Células JJN-3 (ACC 541) adquiridas de DSMZ fueron seleccionadas en BMS para la resistencia a bortezomib. Línea celular de leucemia de granulocitos de células grandes NK humanas NKL con licencia de Dana-Farber Cancer Institute; Línea celular de leucemia de células NK humanas KHYG-1 (JCRB0156) se adquirió de Health Science Research Resources Bank, Japon Health Sciences Foundation.

La capacidad de BMS-936564 para inducir la apoptosis de células CXCR4⁺ se comparó con la capacidad apoptótica del antagonista de CXCR4 de molécula pequeña, AMD3100. La apoptosis se investigó mediante la incubación de las células Ramos con 10 µg/ml de BMS-936564 o anticuerpo de control de isotipo durante 24 horas a 37°C. Para comparación, las células Ramos se incubaron con 6 µM de AMD3100, que corresponde a la concentración que inhibe el flujo de calcio inducido por CXCL12 y la migración. Las células se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés). Se determinó el porcentaje de células positivas para anexina V solamente o ambos anexina V y PI doble positivo. BMS-936564 indujo un aumento de anexina V (31,2 %) y en tinción doble positiva de Anexina V/PI (27,3 %) en comparación con células que se dejaron sin tratar (1,7 % y 4,1 %), se incubaron con anticuerpo de control de isotipo (0,5 % y 2,8 %), o tratados con AMD3100 (2,0 % y 2,7 %) (Figuras 14A y 14B).

Para verificar la especificidad de la respuesta apoptótica a BMS-936564, células madre R1610 que no unen BMS-936564 (datos no presentados) y R1610 transfectados con CXCR4 humano que se unen a BMS-936564 (Figuras 4A-4D) se utilizaron para medir la apoptosis. MDX-1338 (BMS-936564) o isotipo de control se agregaron a las células R1610 y células transfectadas CXCR4 durante 24 horas a 37°C y después teñidas con Anexina V-FITC y de yoduro de propidio (PI). Se determinó el porcentaje de células que son positivas para anexina V solamente o ambos anexina V y PI doble positivo. Las células transfectadas R1610-hCXCR4 exhiben un nivel incrementado de tinción con anexina V y tinción con anexina V/PI en respuesta a la incubación con BMS-936564 (24,3 % y 11,4 %), aún cuando un anticuerpo de control de isotipo (2,5 % y 0,9 %) o cuando sin tratamiento (2,6 % y 0,9 %) tuvieron efectos mínimos (Figura 15A). Las células madre R1610 no presentaron apoptosis después del tratamiento de BMS-936564 (Figura 15B), sugiriendo especificidad para hCXCR4. Posteriormente a estos hallazgos BMS-936564 ha mostrado que induce la apoptosis en varias líneas celulares CXCR4⁺, así como PBMC normal (Tabla 4).

Un resumen de los datos sobre la apoptosis de diferentes líneas celulares CXCR4⁺ inducidas por BMS-936564 en comparación con un control de isotipo se proporciona en la Tabla 5.

Tabla 5. Apoptosis inducida por BMS-936558 *in vitro* en múltiples líneas celulares de mieloma

Línea celular	Expresión CXCR4	Tratamiento del anticuerpo	% positivo de Anexina V	% positivo de Anexina V + 7AAD
MOLP-8	++	Isotipo	16,4	11,9
		BMS-936564	32,7	14,2
RPMI-8226	++	Isotipo	27,1	16,9
		BMS-936564	36,3	24,6
MM.1S	+	Isotipo	20,5	8,4
		BMS-936564	34,1	9,8

JJN-3R	++	Isotipo	15,0	4,8
		BMS-936564	46,8	25,1
OPM-2	++	Isotipo	14,4	2,8
		BMS-936564	31,1	3,7

Los datos resumidos en las Tablas 4 y 5 indican que BMS 936564 induce la apoptosis, y por lo tanto pueden ser un terapéutico eficaz, en prácticamente todas las células del tumor que expresan CXCR4.

5 Ejemplo 12

Estudios adicionales que muestra la inhibición de la proliferación celular tumoral in vivo por los anticuerpos anti-CXCR4

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

En un experimento, $7,5 \times 10^6$ de células de cáncer de mama humano MDA-MB231/ratón se implantaron en la región del costado de cada ratón y se dejó crecer hasta un tamaño medio de 100 mm^3 , calculado por longitud x ancho x altura/2 de los tumores, que fue el día 7 después de la implantación. Los ratones se distribuyeron al azar en diferentes grupos de tratamiento y recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de una primera dosis de anticuerpo en el día 7 después de la implantación, recibieron una segunda dosis de IP del anticuerpo en el día 14 después de la implantación y después recibieron una tercera dosis en el día 46 después de la implantación. Los grupos de ratones ($n = 9$) fueron tratados con o bien (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG1 (15 mg/kg); (iii) control de isotipo IgG4 (15 mg/kg); (iv) IgG1 F7 (15 mg/kg); o (v) IgG4 F7 (15 mg/kg). Los volúmenes tumorales se midieron en intervalos regulares y el promedio y la mediana del volumen del tumor determinado para cada grupo de tratamiento en cada intervalo. Los resultados de este experimento se resumen a continuación en la Tabla 6, que muestra el volumen promedio del tumor (en mm^3) y el % de inhibición de crecimiento del tumor (TGI) en el día 52, y la mediana del volumen del tumor (en mm^3) y % de TGI en el día 59 después de la implantación. Además, uno de los ratones en el grupo de tratamiento IgG4 F7 estaba libre de tumor en el día 59. Los resultados demuestran que el mAb F7 es capaz de inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama MDA-MB231 *in vivo*.

En un segundo experimento, 5×10^6 células de carcinoma de pulmón de pequeñas células humanas DMS79/ratón se implantaron en la región del costado de cada ratón y se dejó crecer hasta un tamaño promedio de 160 mm^3 , calculado por la longitud x ancho x altura/2 de los tumores, que fue el día 7 después de la implantación. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento y recibieron inyecciones intraperitoneales (IP) del anticuerpo en un horario de dosis de Q3Dx5 (cada tres días por cinco veces). Los grupos de ratones ($n = 10$) fueron tratados con (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG4 (10 mg/kg); o (iii) IgG4 F7 (10 mg/kg). Los volúmenes del tumor se midieron en intervalos regulares y el promedio y la mediana del volumen del tumor se determinaron para cada grupo de tratamiento en cada intervalo. Los resultados de este experimento se resumen a continuación en la Tabla 7, que muestra el promedio y la mediana del volumen del tumor (en mm^3) y el % de inhibición del crecimiento del tumor (TGI, por sus siglas en inglés) en el día 34 después de la implantación. Los resultados demuestran que el mAb F7 es capaz de inhibir el crecimiento de células de carcinoma de pulmón de células pequeñas humanas DMS79 *in vivo*.

Tabla 6: inhibición del crecimiento del tumor de células MDA-MB231 *in vivo* por mAb F7

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

Tabla 7: inhibición del crecimiento del tumor de células DMS79 *in vivo* por mAb F7

Tratamiento	Día 34			
	Promedio	TGI(%)	Mediana	TGI(%)
Vehículo	900		882	
Control de Isotipo IgG4	992		903	

IgG4 anti-CXCR4 F7	620	38	599	34
--------------------	-----	----	-----	----

Modelos de tumores de xenoinjertos subcutáneos adicionales se probaron para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento del tumor, en experimentos similares a los descritos anteriormente y en el Ejemplo 9. En un experimento utilizando células de linfoma de células B SU-DHL-6, los resultados mostraron que el tratamiento con el mAb de IgG4 F7 en 15 mg/kg resultó en la inhibición del crecimiento del tumor de aproximadamente 60 %. Del mismo modo, en un experimento utilizando células de linfoma de Burkitt Namalwa, los resultados mostraron que el tratamiento con el mAb de IgG4 F7 en 3 mg/kg resultó en la inhibición del crecimiento del tumor de aproximadamente 70 %. En contraste, no hay inhibición del crecimiento del tumor mediante el mAb F7 se observó en los experimentos utilizando células de carcinoma de pulmón NIH-H226 o células de adenocarcinoma de páncreas humano HPAC. Sin embargo, la tinción de estas células mediante el mAb F7 en experimentos de citometría de flujo mostró la expresión *in vitro* mínima. Aunque las células tumorales *in vivo* se podían teñir mediante el mAb por inmunohistoquímica, no está claro en qué etapa de su crecimiento tumoral CXCR4 comenzó ser expresado. Esto sugiere que la expresión de CXCR4 por estas dos líneas celulares era insuficiente para permitir la inhibición de crecimiento del tumor o la inducción de la apoptosis *in vivo* mediante tratamiento anti-CXCR4.

Ejemplo 13

Inhibición de metástasis de pulmón in vivo por los anticuerpos anti-CXCR4

En este ejemplo, se examinó la capacidad de mAb anti-CXCR4 F7 para inhibir la metástasis de pulmón utilizando un modelo sistémico de tumor de ratón C57. Más específicamente, $0,4 \times 10^6$ células B16-CXCR4 (células B16 transfectadas para expresar CXCR4 humano) se inyectaron por vía intravenosa en cada uno de 30 ratones de la cepa C57. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de diez ratones cada uno, que después fueron tratados con ya sea (i) vehículo (PBS); (ii) control de isotipo IgG4 (5 mg/kg); o (iii) IgG4 F7 (5 mg/kg). El anticuerpo o el vehículo se inyectaron por vía intraperitoneal 30 minutos después de que las células B-16-CXCR4 fueron inyectadas por vía intravenosa. Los pulmones se cosecharon el día 14 y el número de nódulos de metástasis de pulmón se cuantificó. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 8, que muestra el promedio y la mediana del número de metástasis de pulmón en cada grupo. Estos resultados muestran que el tratamiento con el mAb F7 condujo a una reducción en el promedio del número de nódulos metastásicos de pulmón de 56 %, mientras que la reducción era solamente el 15 % con el anticuerpo de control de isotipo, demostrando que el mAb F7 es capaz de inhibir la metástasis de pulmón en un modelo de tumor sistémico.

Tabla 8: Inhibición de metástasis de pulmón *in vivo* por mAb F7

Tratamiento	Número de metástasis de pulmón		% de inhibición de metástasis de pulmón (promedio)
	Promedio	Mediana	
Vehículo	364	397	
Control de Isotipo IgG4	309	294	15 %
IgG4 anti-CXCR4 F7	157	186	56 %

Ejemplo 14

BMS-936564 inhibe el crecimiento tumoral en Modelos de linfoma de no Hodgkin (NHL) in vivo

La actividad *in vivo* de BMS-936564 y anti-CXCL12 en la inhibición del crecimiento tumoral fue probado en ratones SCID con xenoinjertos de tumor. Los ratones SCID fueron implantados por vía subcutánea con 10 millones de células Ramos (línea celular de linfoma de Burkitt de linfoblastos B humanos) en 0,1 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y 0,1 ml de MATRIGEL®, utilizando una jeringa de 1 cm³ y una aguja de media pulgada calibre 25. Cuando se alcanzó un promedio y mediana del tamaño del tumor de 80 mm³, los ratones se asignaron al azar (n = 8) de acuerdo con el volumen del tumor. En los días 0 y 7 cada animal se inyectó por vía intraperitoneal (IP) con ~200 µl de BMS-936564 (15 mg/kg/dosis), anti-CXCL12 (15mg/kg/dosis), control de isotipo de IgG4 humana (15 mg/kg/dosis), rituximab (15 mg/kg/dosis) o PBS (control de vehículo) en 0,3 ml de IP. Los estudios de respuesta de dosis se había encontrado previamente que 15 mg/kg es una dosis eficaz de rituximab (datos no mostrados). Todas las dosis de anticuerpos fueron bien toleradas y no se observaron pérdidas de peso corporal. Los tumores y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los volúmenes del tumor se miden en tres dimensiones (LxWxH/2) con un Caliper electrónico digital de Fowler (Modelo 62379-531; Fred V. Fowler Co., Newton, MA), y los datos se registraron electrónicamente utilizando el software Study Director de StudyLog Systems, Inc. (South San Francisco, CA). Los animales fueron revisados diariamente para cambios posturales, de apariencia y respiratorios, así como letargo. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron el punto final de 2.000 mm³ o aparecieron ulcerados.

BMS-936564 y el control positivo, rituximab, inhibió el crecimiento del tumor en comparación con el vehículo y el control de isotipo. El tratamiento con BMS-936564 dio como resultado una mediana de inhibición del crecimiento de 99 % el día 21 y la inhibición se mantuvo durante 60 días (Figura 16). En contraste, el anti-CXCL12 no inhibió el crecimiento

del tumor y se realizó de manera similar al anticuerpo de control de isotipo.

Ejemplo 15

5 *BMS-936564 inhibe el crecimiento de tumor en modelos de leucemia mieloide aguda (AML) in vivo*

Para evaluar la eficacia del anticuerpo en AML, se utilizaron dos modelos de xenoinjertos de ratón resistentes a citarabina, HL-60 y Nomo-1. La expresión de CXCR4 en cada línea celular se confirmó mediante tinción de FACS (Figura 4A). Los ratones SCID se ζ implantaron por vía subcutánea con 10 millones de células HL-60 como se describe en el Ejemplo 14. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 136 mm³, los ratones se seleccionaron al azar (n = 10) y se dosificó IP en los días 0, 3, 7, 10 y 14 con BMS-936564 (10 mg/kg/dosis), control de isotipo de IgG4 humano (10 mg/kg/dosis), o PBS (control de vehículo), y monitoreados por 41 días. El día 27, la mediana de inhibición del crecimiento de tumor fue de 88 % y 83 % cuando se compara con grupos de isotipo y vehículos, respectivamente (Figura 17A).

En el modelo de Nomo-1 (7,5 millones de células implantadas subcutáneamente como en el ejemplo 14). Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 84 mm³, los ratones se seleccionaron al azar (n = 9) y se dosificaron en los días 0, 3, 7, 10 y 14 con BMS-936564 (10 mg/kg/dosis), control de isotipo IgG4 (10 mg/kg/dosis), PBS (control del vehículo) o citarabina (20, 60 o 90 mg/kg/dosis), y monitoreados durante 57 días. El día 34, la mediana de la inhibición del crecimiento de tumor de ratones tratados con BMS-936564 se retrasó considerablemente en un 88 % en comparación con el control del isotipo o vehículo (Figura 17B). Como era de esperar, la citarabina (también conocida como arabinofuranosil citidina o Ara-C) no inhibió el crecimiento del tumor (Figura 17B).

Ejemplo 16

25 *BMS-936564 inhibe el crecimiento tumoral en Modelos de mieloma múltiple (MM) in vivo*

Varias células de mieloma CXCR4⁺, es decir, MOLP8, JJ-3R, JJN-3, RPMI-8226, MM.1S y OPM-2, se probaron para determinar la sensibilidad a BMS-936564 en modelos de tumores de xenoinjertos SCID. En todos los experimentos, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal en los días 0 y 7 con un control de isotipo IgG4 y un control de vehículo de PBS. Células MOLP-8 (2,5 millones) se implantaron en ratones SCID como se describe en el Ejemplo 14. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 100 mm³, los ratones se seleccionaron al azar en grupos de 8 ratones (n = 8) y se dosificaron en los días 0, 3, 7, 10 y 14 con BMS-936564 (10 mg/kg/dosis) solo o en combinación con 50 mg/kg de lenalidomida (REVLIMID®) o en combinación con 0,8 mg/kg de bortezomib (VELCADE®). BMS-936564 retrasó significativamente el promedio de crecimiento de tumor en un 66 % y un 56 % en comparación con el control de anticuerpo de isotipo en el día 25 (último día cuando todos los ratones en cada cohorte permanecieron en el estudio) (Figura 18A). Tumores de MOLP8 eran relativamente resistentes a la lenalidomida y bortezomib y la eficacia de BMS-936564 no mejoró cuando se combinó con cualquiera de los fármacos (Figura 18A). Al final del estudio en el día 42, 5 de 8 ratones permanecieron en el grupo de BMS-936564, mientras que ningún ratón permaneció en el grupo tratado con isotipo.

Células JJ-3R resistentes a Bortezomib (5 millones) fueron implantadas en ratones SCID como se describió. En un volumen de tumor de aproximadamente 100 mm³, los ratones se seleccionaron al azar (n = 8), dosificados con BMS-936564 (10 o 30 mg/kg/dosis de IP) o lenalidomida (50mg/kg/dosis de IP) o bortezomib (0,8 mg/kg/dosis IV) en los días 0, 4, 7, 11 y 14, y monitoreados por 25 días. La median de crecimiento de tumor con el tiempo se muestra en la Figura 18B. Ni lenalidomida ni bortezomib solos inhibieron el crecimiento del tumor, mientras que la mediana de inhibición de crecimiento del tumor fue de 100 % para los ratones tratados con BMS-936564 en el día 25 en comparación con los ratones tratados con el control de isotipo. Al final del estudio, 4 de cada 7 ratones estaban libres de tumor en el grupo de 30-mg/kg de BMS-936564.

Utilizando las células madre JJN-3, bortezomib y lenalidomida, no mostraron prácticamente ninguna eficacia inhibidora a tumores. 5 millones de células de JJN-3/ratón se implantaron en ratones SCID y los ratones fueron seleccionados al azar en grupos de 8, cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 77 mm³. Los ratones se dosificaron con MDX-1338 (10 mg/kg/dosis IP) solo o en combinación con bortezomib (0,8 mg/kg/dosis IV) o lenalidomida (50 mg/kg/dosis IP) en los días 0, 3, 7, 10, y 14. MDX-1338 inhibió el crecimiento del tumor en un 52 % el día 25 en comparación con los ratones tratados con el control de vehículo (Figura 18C). Bortezomib exhibió una eficacia marginal en la inhibición de crecimiento de tumor en este modelo celular JJN-3, pero en combinación con MDX-1338 incrementó marginalmente el nivel de inhibición inducida por MDX-1338 a 58 % el día 25 en comparación con el control de vehículo (Figura 18C). Lenalidomida fue ineficaz en la inhibición de crecimiento del tumor, y la combinación de lenalidomida y MDX-1338 era de forma similar ineficaz, exhibiendo menos inhibición que MDX-1338 solo (Figura 18D).

Células RPMI-8226 (10 millones) se implantaron en ratones SCID como se describió en el Ejemplo 14. Los ratones se seleccionaron al azar (n = 8) cuando el volumen de los tumores alcanzaron aproximadamente 20 mm³, dosificados en los días 0, 3, 7, 10 y 14 con MDX-1338 (10 mg/kg/dosis) por sí solo o en combinación con 50 mg/kg de lenalidomida o en combinación con 0,8 mg/kg de bortezomib. MDX-1338 retrasó significativamente el promedio del crecimiento del tumor en un 53 % en comparación con el control del vehículo en el Día 44 (Figura 18E). Lenalidomida sola exhibió

una eficacia marginal en este modelo RPMI-8226, pero mejoró la eficacia de la inhibición del crecimiento de tumor MDX-1338 observado con 50 mg/kg de lenalidomida en combinación con 10 mg/kg de MDX-1338 fue 79 % en el día 44 en comparación con los control de isotipo (Figura 18E). Bortezomib exhibió una buena eficacia en la inhibición del promedio de crecimiento del tumor en un 70 % en el día 44 en comparación con el control de isotipo (Figura 18F), y mejoró ligeramente la eficacia de MDX-1338 que aumentó desde 61 % de promedio de inhibición de crecimiento de tumor hasta 82 % en el día 44 en comparación con el control de isotipo (Figura 18F).

Células MM.1S (10 millones) fueron implantadas en ratones SCID y seleccionados al azar (n = 8), cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 30 mm³, dosificado en los días 0, 4, 7, 11 y 14 con MDX-1338 (10 mg/kg/dosis) por sí solo o en combinación con 100 mg/kg de lenalidomida. MDX-1338 retrasó significativamente el promedio del crecimiento de tumor en un 60 % en comparación con el control de isotipo en el día 25 (Figura 21). Lenalidomida sola fue aún más eficaz, retrasando el promedio del crecimiento del tumor en un 70 % el día 25, y la combinación de MDX-1338 y lenalidomida inhibió el promedio de crecimiento del tumor 86 % en el día 25 (Figura 18G).

Tabla 9: expresión CXCR4, apoptosis e inhibición del crecimiento del tumor en múltiples líneas celulares de mieloma

Línea celular	Expresión CXCR4	Apoptosis por MDX+1338 solo	Apoptosis en la presencia de Ab reticulado	Inhibición de crecimiento de tumor
MOLP-8	++	-	+	MDX-1338=56 % REVLIMID® solo = 35 % Combinación=68 %
JJN-3R	++	-	+++	MDX-1338=100 %
JJN-3	++	-	+++	
RPMI-8226	++	-	++	MDX-1338=61 % Comb.c/lenalid=90 % Comb.c/Bortez=82 %
MM.1S	+	-	++	MDX-1338=60 % REVLIMID® = 70 % Combinación=86 %
OPM-2	++	-	++	MDX-1338=46 % Comb.c/Bortez=92 %

Células OPM-2 (10 millones) se implantaron en ratones SCID como se ha descrito. En un volumen de tumor de aproximadamente 77 mm³, los ratones se seleccionaron al azar (n = 8), dosificados con MDX-1338 (10 mg/kg/dosis IP) solo o en combinación con bortezomib (0,8 mg/kg/dosis IV) o lenalidomida (50 mg/kg/dosis IP) en los días 0, 4, 7, 11 y 14. MDX-1338 inhibió la mediana de crecimiento del tumor en un 45 % en el día 24 en comparación con los ratones tratados con el control de vehículo (Figura 18H). El bortezomib inhibió el crecimiento del tumor en un 75 % en el día 24, y la combinación de MDX-1338 y bortezomib fue altamente eficaz, inhibiendo la mediana del crecimiento de tumor en un 99 % en el día 24 (Figura 18H). La lenalidomida exhibió una eficacia mínima en este modelo OPM-2, y no mejora significativamente la eficacia del MDX-1338 (Figura 18i).

Los resultados de inhibición de crecimiento del tumor obtenidos en estos xenoinjertos de células de MM se resumen en la Tabla 9, junto con la expresión de CXCR4 y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por MDX-1338.

Los ejemplos 14-16 demuestran que cuando se administra como monoterapia en tumores establecidos, BMS-936564 muestra una actividad anti-tumoral en múltiples modelos de xenoinjertos de NHL, AML y MM. Desde BMS-936564 es un anticuerpo IgG4, que no provoca la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Los datos proporcionados en el Ejemplo 11 sugieren que BMS-936564 induce la apoptosis como un mecanismo de inhibición del crecimiento del tumor.

REFERENCIAS

- Alsayed Y et al. (2007) Blood 109(7):2708-17.
- Amadori S et al. (1991) J Clin Oncol 9(7): 1210-4.
- Angal S et al. (1993) Mol Immunol 30(1): 105-8.
- Azab AK et al. (2009) Blood 113(18):4341-51.
- Beider K et al. (2011) Exp Hematol 39(3):282-92.
- Berndt C et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:12556-61.
- Bertolini F et al. (2002) Cancer Res 62(11):3106-12.

Bleul CC et al. (1996) *Nature* 382(6594):829-33.

Breems OA et al. (2005) *J Clin Oncol* 23(9): 1969-78.

5 Broxmeyer HE et al. (2005) *J Exp Med* 201: 1307-18.

Burger JA et al. (1999) *Blood* 94:3658-67.

Cancer Facts and Figures 2008, American Cancer Society, Atlanta GA (2008).

10 Carnec X et al. (2005) *J Virol* 79: 1930-8.

Chow KU et al. (2002) *Haematologica* 87:33-43.

15 Corcione A et al. (2000) *J Natl Cancer Inst* 92:628-35.

Corvata N et al. (2011) Poster presented at 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April 2-6, 2011, Orlando, FL.

20 Crazzolara R et al. (2001) *Br J Haematol* 115:545-53.

Dar A et al. (2011) *Leukemia* 25(8): 1286-96.

Devine SM et al. (2004) *J Clin Oncol* 22: 1095-102.

25 Di Salvo J et al. (2000) *Eur J Pharmacol* 409: 143-154.

Feng Y et al. (1996) *Science* 272:872-7.

30 Flomenberg N et al. (2005) *Blood* 106:1867-74.

Friedberg JW et al. (2008) *J Clin Oncol* 26(2):204-10.

Garg H et al. (2006) *J Leukocyte Biol* 79:351-62.

35 Gazitt Y (2001) *J Hematother Stem Cell Res* 10:229-36.

Geminder et al. (2001) *J Immunol* 167:4747-57.

40 Gisselbrecht C et al. (2011) Novel Agents for Diffuse Large B-cell Lymphoma, ASCO Education Book 2011, page 321.

Gisselbrecht C et al. (2010) *J Clin Oncol* 28:4184-90.

45 Gonzalo JA et al. (2000) *J Immunol* 165:499-508.

Guleng B et al. (2005) *Cancer Res* 65(13):5864-71.

Gupta SK et al. (1998) *J Biol Chem* 273(7):4282-7.

50 Hesselgesser J et al. (1997) *Curr Biol* 7(2): 112-21.

Hiller DJ et al. (2011) *Surgery* 150(3):459-65.

55 Hollinger et al. (2005) *Nature Biotech* 23(9): 1126-36.

Hosokawa Y et al. (2005) *Clin Exp Immunol* 141:467-74.

Hou T et al. (1998) *J Immunol* 160:180-8.

60 Hwang JH et al. (2003) *J Clin Endocrinol Metab* 88:408-16.

Jemal A et al. (2005) *CA Cancer J Clin* 55: 10-50.

65 Jemal A et al. (2008) *CA Cancer J Clin* 58:71-96.

Jemal A et al. (2009) CA Cancer J Clin 59:225-49.

Jiang YP et al. (2006) Gynecol Oncol 103(l):226-33.

5 Jin DK et al. (2006) Nat Med 12:557-67.

Jin L et al. (2008) Mol Cancer Ther 7:48-58.

10 Kabat EA et al. (1991) sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242.

Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Melo-Cardenas J, Kuhne MR, Sabbatini P, Cohen LJ, Cardarelli JM, Kipps TJ and Castro JE (2012) Abstract for presentation at American Society of Hematology (ASH) 54th Annual Meeting, December 8-11, 2012, Atlanta, GA.

15 Kewalramani T et al. (2004) Blood 103(10):3684-8.

Koshiba T et al. (2000) Clin Cancer Res 6:3530-5.

20 Laverdiere C et al. (2005) Clin Cancer Res 11:2561-7.

Lee B et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(9):5215-20.

Libura J et al. (2002) Blood 100:2597-606.

25 Loetscher M et al. (1994) J Biol Chem 269(l):232-7.

Lonberg N et al. (1994) Nature 368 (6474):856-859.

30 Liu Z et al. (2011) Diabetologia 54(8):2067-76.

Marechal R et al. (2009) Brit J Cancer 100(9): 1444-51.

Matthys P et al. (2001) J Immunol 167:4686-92.

35 Mohle R et al. (1998) Blood 91(12):4523-30.

Mohle R et al. (1999) Leukemia 13: 1954-9.

40 Muller A et al. (2001) Nature 410:50-6.

Murphy PM (2001) New Engl J Med 345(11):833-5.

Nervi B et al. (2009) Blood 113:6206-14.

45 Oberlin E et al. (1996) Nature 382:833-5.

Olafsen et al. (2010) Semin Nucl Med 40(3): 167-81.

50 Ottaiano A et al. (2006) Clin Cancer Res 12(9):2795-803.

PCT Publication No. WO 02/43478, published June 6, 2002 by Medarex, Inc. and Kirin Beer Kabushiki Kaisha.

PCT Publication No. WO 2008/060367, published May 22, 2008 by Medarex, Inc.

55 PCT Publication No. WO 2008/142303, published November 27, 2008 by Pierre Fabre Medicament.

PCT Publication No. WO 2009/140124, published November 19, 2009 by Eli Lilly and Co.

60 PCT Publication No. WO 2010/043650, published April 22, 2010 by Ablynx NV.

Ping YF et al. (201 1) J Pathol 224(3):344-54.

Porvasnik S et al. (2009) The Prostate 69: 1460-9.

65 Raab MS et al (2009) Lancet 374 (9686):324-39.

- Rempel SA et al. (2000) Clin Cancer Res 6: 102-11.
- Richer M et al. (2009) Oncol Rep 21:76-7.
- 5 Righi E et al. (2011) Cancer Res 71(16):5522-34.
- Robinson JR (ed.) (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 10 Roccaro AM, Sacco A, Kuhne M, Azab A, Maiso P, Zhang Y, Liu Y, Michaela R, Ngo HT, Quang P, Cardarelli JA and Ghobrial IM (2012) Abstract for presentation at American Society of Hematology (ASH) 54th Annual Meeting, December 8-11, 2012, Atlanta, GA.
- Rombouts EJC et al. (2004) Blood 104:550-7.
- 15 Rummel MJ et al. (2002) Semin Oncol 29(Suppl. 13): 12- 4.
- Scala S et al. (2005) Clin Cancer Res 11:1835-41.
- 20 Scotton C et al. (2001) Br. J. Cancer 85:891-7.
- Schrader AJ et al. (2002) Br J Cancer 86: 1250-6.
- Siegel R et al. (201 1) CA Cancer J Clin 61(4):212-36.
- 25 Singer CR and Goldstone AH (1986) Clin Haematol 15: 105.
- Spano JP et al. (2004) Ann Oncol 15:613-7.
- 30 Spoo AC et al. (2007) Blood 109(2):786-91.
- Staller P et al. (2003) Nature 425:307-11.
- Tachibana K et al. (1998) Nature 393(6685):591-4.
- 35 Taichman RS et al. (2002) Cancer Res 62: 1832-7.
- Tavor S et al. (2004) Cancer Res 64(8):2817-24.
- 40 Terada R et al. (2003) Lab Invest 83:665-72.
- U.S. Patent No. 5.399. 163, issued March 21, 1995 to Petersen SF et al.
- U.S. Patent No. 5.383.851, issued January 24, 1995 to McKinnon, Jr. CN et al.
- 45 U.S. Patent No. 4.941.880, issued July 17, 1990 to Burns M.
- U.S. Patent No. 6.794.132, issued September 21, 2004 to Buechler J et al.
- 50 U.S. Patent No. 7.041.870, issued May 9, 2006 to Tomizuka K et al.
- U.S. Patent No. 7.674.618, issued March 9, 2010 to Black A.
- U.S. Publication 2012/0052097, published March 1, 2012 by Fetzer OS et al.
- 55 Vicari AP et al. (2002) Cytokine Growth Factor Rev 13: 143-154.
- Wang N et al. (2005; JTransl Med 3:26-33.
- 60 Weng AP et al. (2003) Am J Clin Pathol 119:424-30.
- Zeelenberg IS et al. (2003) Cancer Res 63:3833-9.
- Zeng Z et al. (2009) Blood 113(24):6215-24.
- 65 Zhang et al. (2002) J Biol Chem 277(27):24515-21.

Zou Y et al. (1998) Nature 393(6685):595-9.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY				
	<120> TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS CON UN ANTICUERPO ANTI-CXCR4				
	<130> 119 O O-WO-PCT				
10	<140>				
	<141>				
	<150> 61/557.815				
15	<151> 09-11-2011				
	<150> 61/569.113				
	<151> 09-12-2011				
20	<160> 51				
	<170> PatentIn Ver. 3.3				
	<210> 1				
25	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> <i>Homo sapiens</i>				
	<400> 1				
30		Ser	Tyr	Ser	Met
		1			5
	<210> 2				
	<211> 5				
35	<212> PRT				
	<213> <i>Homo sapiens</i>				
	<400> 2				
		Ser	Tyr	Ser	Met
40		1			5
	<210> 3				
	<211> 5				
	<212> PRT				
45	<213> <i>Homo sapiens</i>				
	<400> 3				
		Ser	Tyr	Ser	Met
		1			5
50	<210> 4				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> <i>Homo sapiens</i>				
55	<400> 4				
		Ser	Tyr	Ser	Met
		1			5
60	<210> 5				
	<211> 17				

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 5 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 6
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 9
 Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 45 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 10

ES 2 705 001 T3

	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
	1				5					10					15	
5	<210> 11 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 11															
10	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
	1				5					10					15	
15	<210> 12 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 12															
20	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
	1				5					10					15	
25	<210> 13 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 13															
30	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala					
	1				5					10						
35	<210> 14 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 14															
40	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala					
	1				5					10						
45	<210> 15 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 15															
50	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ala					
	1				5					10						
55	<210> 16 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 16															
	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Trp	Leu	Ala					
	1				5					10						
	<210> 17															

ES 2 705 001 T3

	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 17	
		Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
		1 5
10	<210> 18	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 18	
		Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
		1 5
20	<210> 19	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19	
25		Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
		1 5
30	<210> 20	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20	
35		Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
		1 5
40	<210> 21	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 21	
		Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
		1 5
45	<210> 22	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 22	
		Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
		1 5
55	<210> 23	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

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

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

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

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 705 001 T3

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

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

<400> 27

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

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

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30	

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

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

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

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

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

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

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

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 30

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

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

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

ES 2 705 001 T3

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<400> 31

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

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

<400> 32

ES 2 705 001 T3

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

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

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

<400> 33

ES 2 705 001 T3

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tca	tac	att	agt	agt	aga	agt	aga	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	tca	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	tac	ggg	ggg	caa	ccc	cct	tac	tac	tac	tac	tac	ggg	atg	336
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100					105					110			
gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120				125					

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

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

<400> 34

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

ES 2 705 001 T3

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt	144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca tac att agt agt aga agt aga agc ata tac tac gca gac tct gtg	192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tac	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg	336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met	
100 105 110	
gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca	375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120 125	

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

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

<400> 35

ES 2 705 001 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tca	tac	att	agt	agt	cgt	agt	aaa	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Lys	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	agg	aac	tca	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Ser	Leu	Tyr	
	65				70					75				80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	tac	ggg	ggg	caa	ccc	cct	tac	tac	tac	tac	tac	ggg	atg	336
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100					105					110			
gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120					125				

5 <210> 36
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(375)

15 <400> 36

ES 2 705 001 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
tca	tac	att	agt	agt	aga	agt	aga	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	tca	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70				75					80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	gat	tac	ggg	ggg	caa	ccc	cct	tac	cac	tac	tac	tac	ggg	atg	336
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100					105					110			
gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120					125				

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

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

<400> 37

ES 2 705 001 T3

```

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

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

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

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

```

<210> 38
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

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

<400> 38

```

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

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

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

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca cca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

```

	acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105	
5	<210> 39	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(321)	
	<400> 39	
	gtc atc tgg gtg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga	48
	Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	gac aga gtc acc atc act tgt cgg acg agt cag ggt att agc agc tgg	96
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
	20 25 30	
	tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct gag ctc ctg atc	144
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg	288
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg	
	85 90 95	
15	acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105	
20	<210> 40	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(321)	
	<400> 40	

```

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

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

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

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
             50             55             60

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

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

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

```

<210> 41
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 43

<211> 125

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

15

<210> 44

<211> 125

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

15

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

20

ES 2 705 001 T3

```

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

```

5 <210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 47

```

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

```

15 <210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 48

ES 2 705 001 T3

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

100 105

5 <210> 49
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 49

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

15 <210> 50
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 50

ES 2 705 001 T3

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

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

 <400> 51

5

ES 2 705 001 T3

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

ES 2 705 001 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 para su uso en un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o la inducción de apoptosis de células de mieloma múltiple en un sujeto afectado por mieloma múltiple y de esta manera tratar al sujeto, en donde el receptor CXCR4 se expresado en la superficie de células de mieloma múltiple en el sujeto y en donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo o un fragmento del mismo para inhibir directamente el crecimiento y/o la proliferación y/o inducir la apoptosis de las células de mieloma múltiple en el sujeto.
2. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano y el anticuerpo o el fragmento del mismo se unen a un receptor CXCR4 humano.
3. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mieloma múltiple es mieloma múltiple recurrente o refractario.
4. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son para administración al sujeto como monoterapia.
5. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo inhiben la actividad del receptor CXCR4 y aumentan la sensibilidad de las células de mieloma múltiple a un agente quimioterapéutico.
6. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son para la administración al sujeto en combinación con cirugía, radiación y/o uno o más agentes terapéuticos.
7. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son para la administración al sujeto en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.
8. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es:
 - (a) lenalidomida y/o dexametasona;
 - (b) bortezomib y/o dexametasona.
9. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento de los mismos.
10. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprenden los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, como se delinea usando el sistema Kabat, en una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 25, y los dominios de CDR1, CDR2 y CDR3, como se delinea usando el sistema Kabat, de una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados, cuya la secuencia se establece en la SEQ ID NO: 29.
11. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, una región variable de de cadena pesada CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO:9, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende los aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21.
12. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos consecutivamente ligados que tienen la secuencia establecida en SEQ ID NO: 29.
13. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son BMS-936564 o un fragmento del mismo.

14. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son un anticuerpo IgG1 o IgG4 o un fragmento de los mismos.
- 5 15. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo son un anticuerpo humano o un fragmento del mismo y son para su administración al sujeto a una dosis de 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal.
- 10 16. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es BMS-936564 y es para su administración al sujeto en combinación con lenalidomida y dexametasona en un régimen de dosificación que comprende:
- 15 (a) BMS-936564 (1, 3 o 10 mg/kg) administrado como una infusión intravenosa de 60 minutos los Días 1, 8, 15, 22, 29 y 36 (Ciclo 1) y los Días 1, 8, 15 y 22 (Ciclo 2 y ciclos posteriores);
- (b) lenalidomida (25 mg por vía oral) administrada durante 21 días (Días 15-35; Ciclo 1) y Días 1-21 (Ciclo 2 y ciclos posteriores); y
- (c) dexametasona (40 mg) administrada los Días 15, 22, 29 y 36 (Ciclo 1) y los Días 1, 8, 15 y 22 (Ciclo 2 y ciclos posteriores).
- 20 17. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es BMS-936564 y es para su administración al sujeto en combinación con bortezomib y dexametasona en un régimen de dosificación que comprende:
- 25 (a) BMS-936564 (1, 3 o 10 mg/kg) administrado como una infusión intravenosa de 60 minutos los Días 1, 8, 15, 22 y 29 (Ciclo 1) y los Días 1, 8 y 15 (Ciclo 2 y ciclos posteriores);
- (b) bortezomib (1,3 mg/m²) administrado como un bolo intravenoso de 3-5 segundos los Días 15, 18, 22 y 25 (Ciclo 1) y los Días 1, 4, 8, 11 (Ciclo 2 y ciclos posteriores); y
- (c) dexametasona (20 mg) administrada los Días 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25 y 26 (Ciclo 1) y los Días 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 y 12 (Ciclo 2 y ciclos posteriores).
- 30 18. Un kit que comprende una dosis de un anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 para su uso en un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o inducir la apoptosis de células de mieloma múltiple en un sujeto afectado por mieloma múltiple y tratar de esta manera al sujeto, en donde el receptor CXCR4 se expresa en la superficie de las células de mieloma múltiple en el sujeto y en
- 35 donde el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo o el fragmento del mismo para directamente inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o inducir la apoptosis de las células de mieloma múltiple en el sujeto y en donde el kit comprende además instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 40 19. El kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el anticuerpo anti-CXCR4 o el fragmento del mismo comprenden los dominios CDR1, CDR2 y CDR3, como se delinea usando el sistema Kabat, de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3, como se delinea usando el sistema Kabat, en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia del amino ácido establecida en la SEQ ID NO: 29.
- 45 20. El kit para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19, en el que el anticuerpo anti-CXCR4 o el fragmento del mismo son BMS-936564 o un fragmento del mismo.

FIG. 1A

Anti-CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VH

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

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

CDR1

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

CDR2

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

CDR2

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

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

CDR3

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

CDR3

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

FIG. 1B

Anti-CXCR4 Fab BMS-936564/F7/MDX-1338 VK

Segmento V: L15
 Segmento J: JK1

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

CDR1

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

**CDR2**

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

CDR2

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

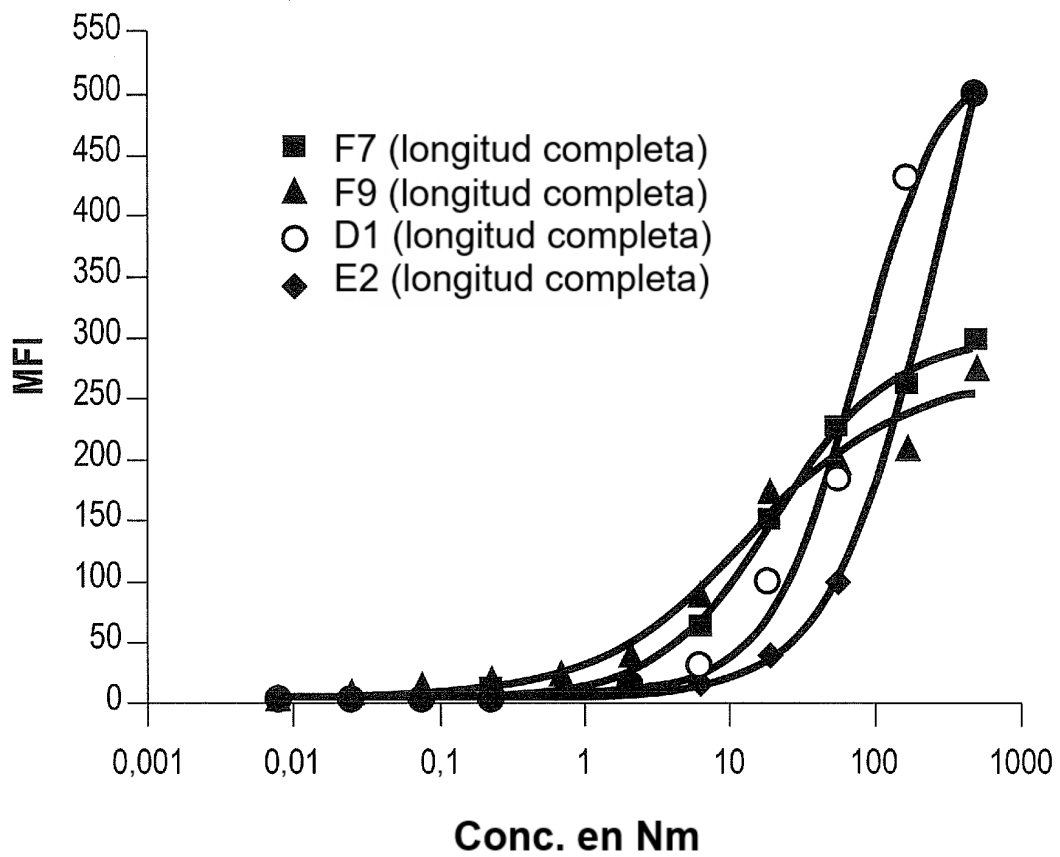
**CDR3**

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

CDR3

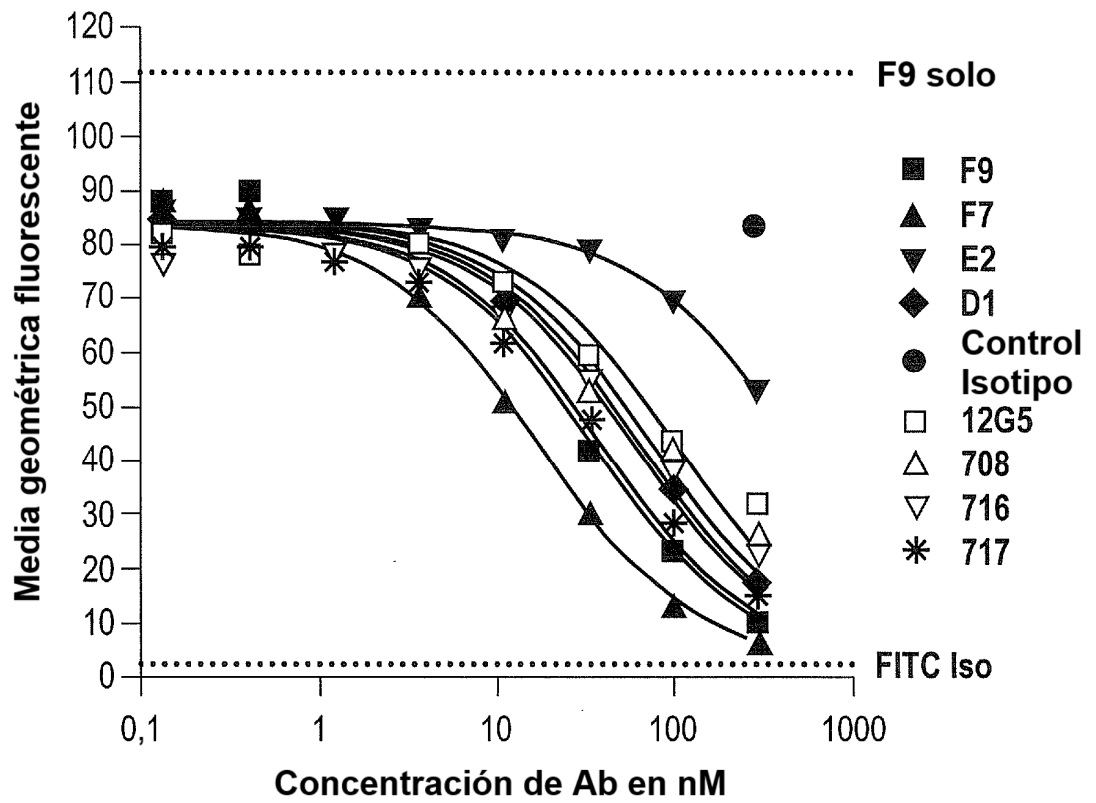
~~~~~  
 Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K  
 271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 2



|      | F7 (longitud completa) | F9 (longitud completa) | D1 (longitud completa) | E2 (longitud completa) |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| EC50 | 21,11                  | 13,96                  | 79,87                  | 289,8                  |

FIG. 3



|      | F9    | F7    | E2    | D1    | 12G5  | 708   | 716   | 717   |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EC50 | 34,39 | 17,01 | 468,8 | 59,17 | 101,9 | 76,32 | 64,68 | 38,79 |

FIG. 4A

# Líneas celulares AML

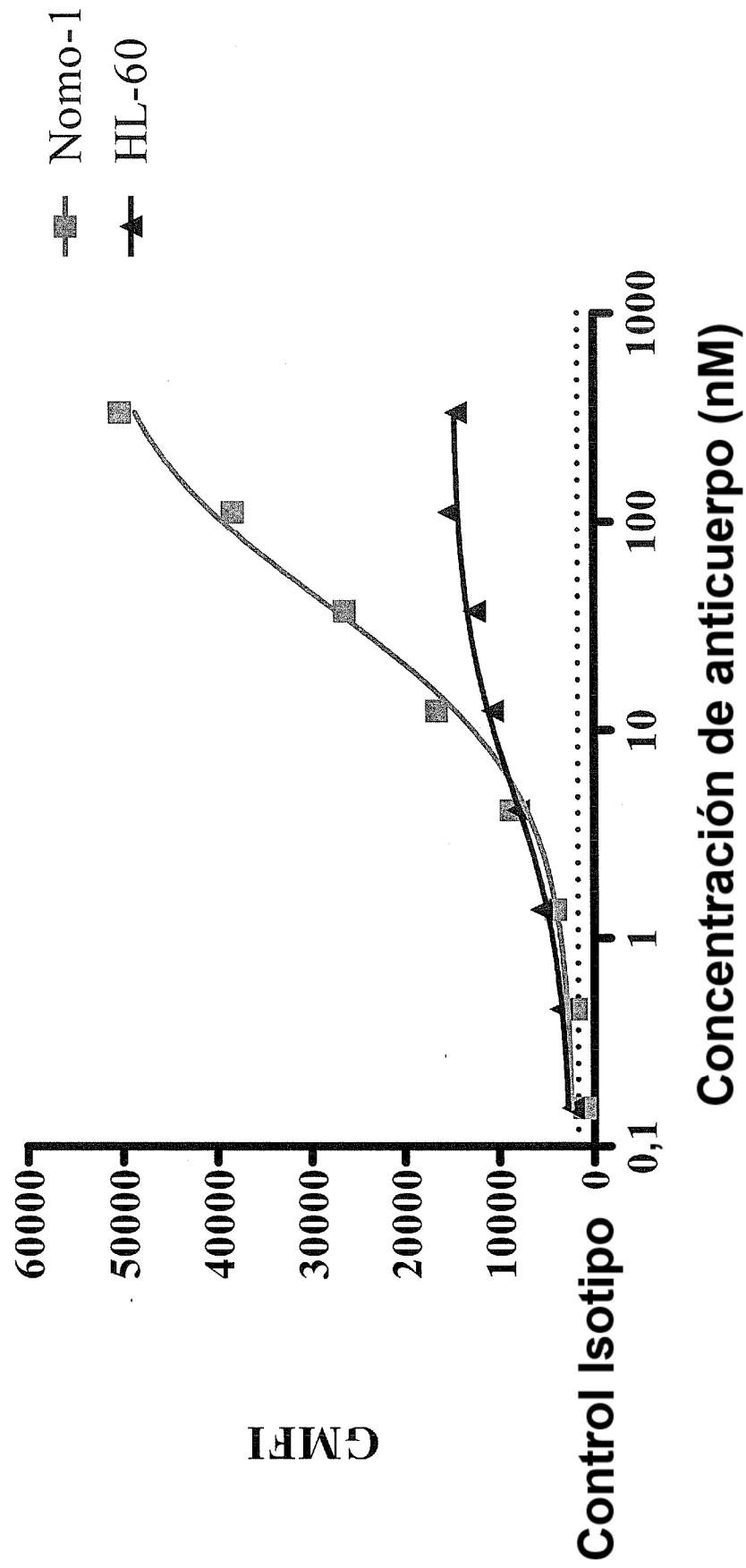


FIG. 4B

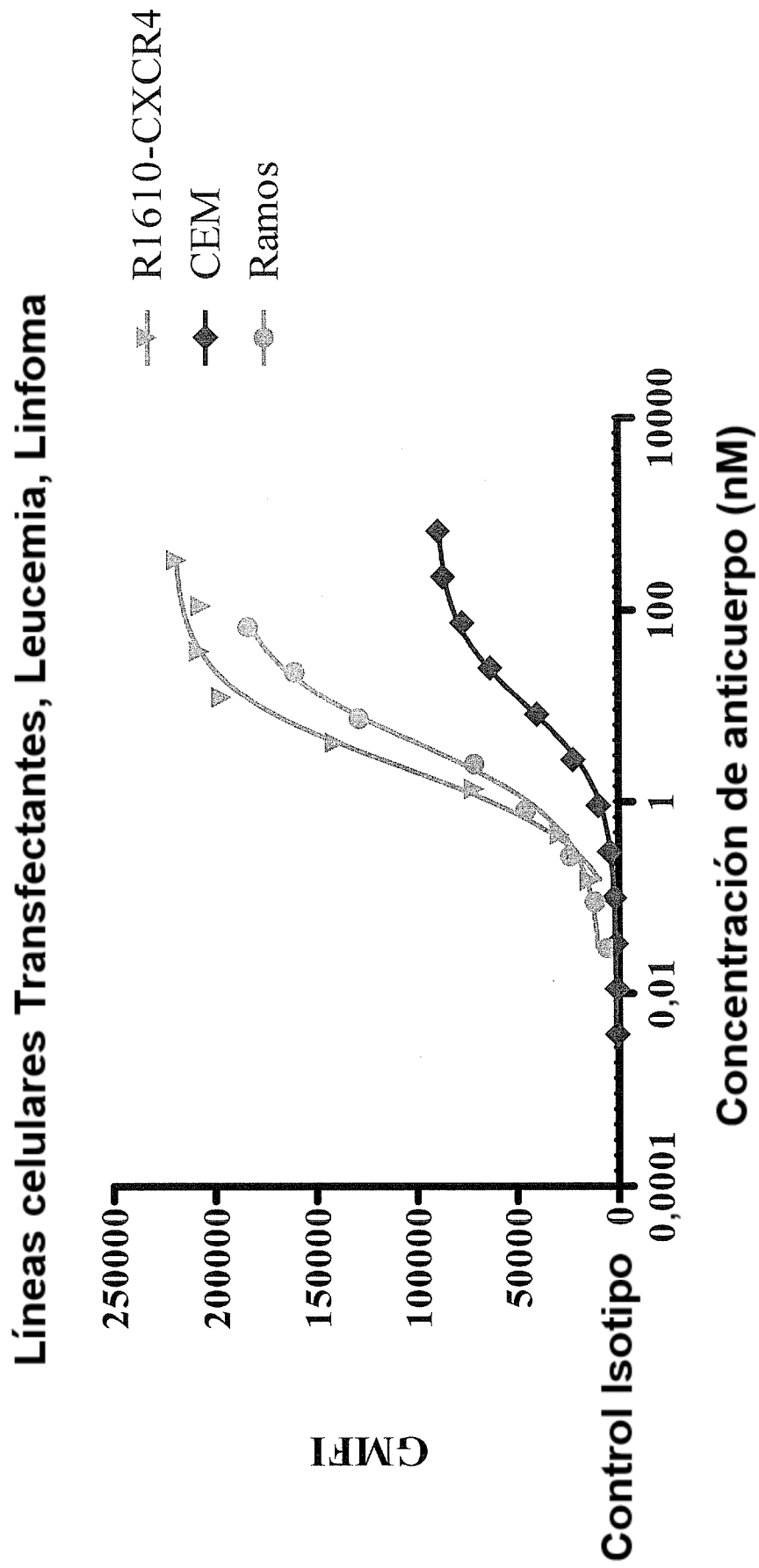
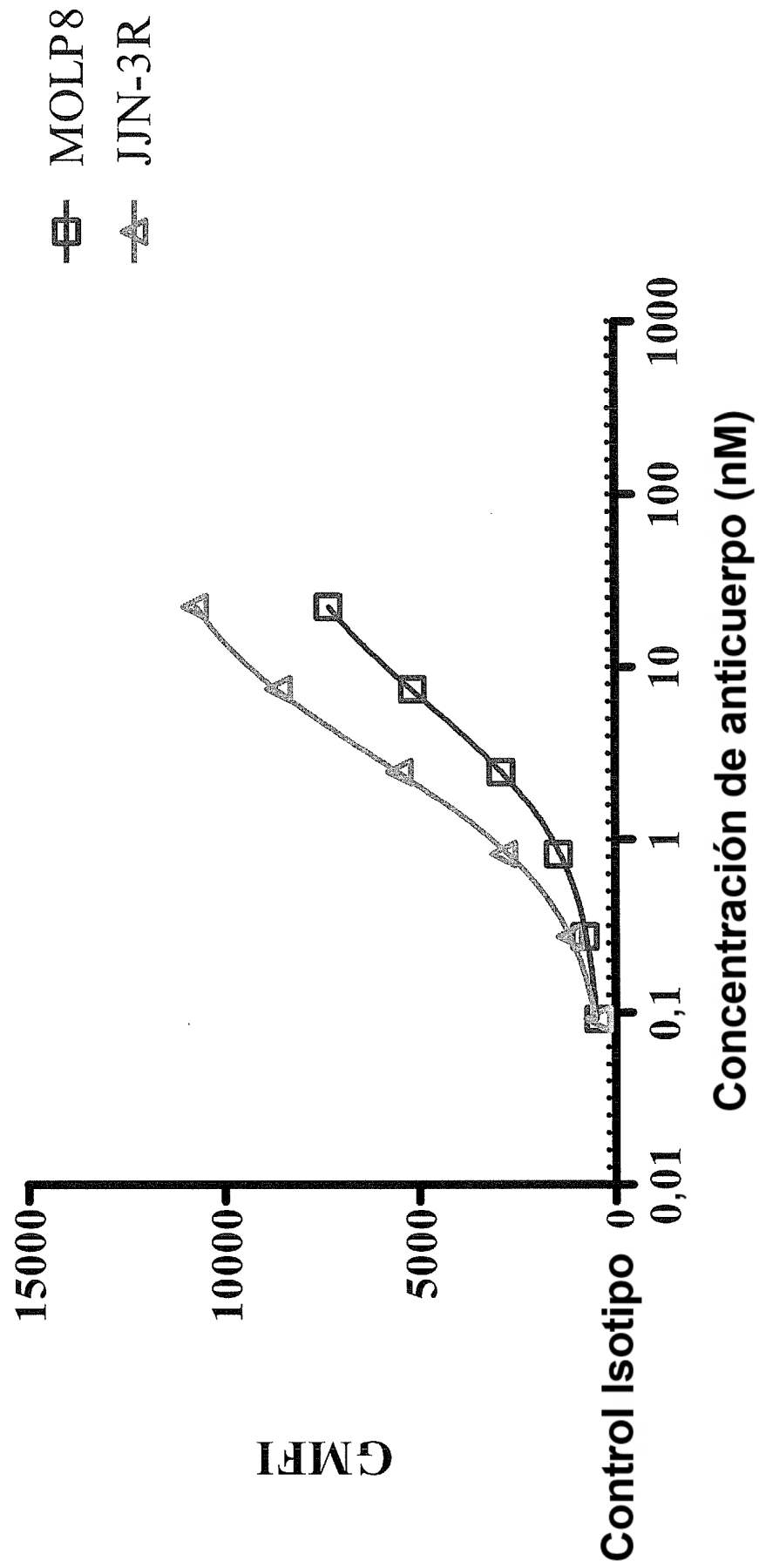


FIG. 4C

**Líneas celulares MM**



**FIG. 4D**  
**PBMC de Pacientes con AML**

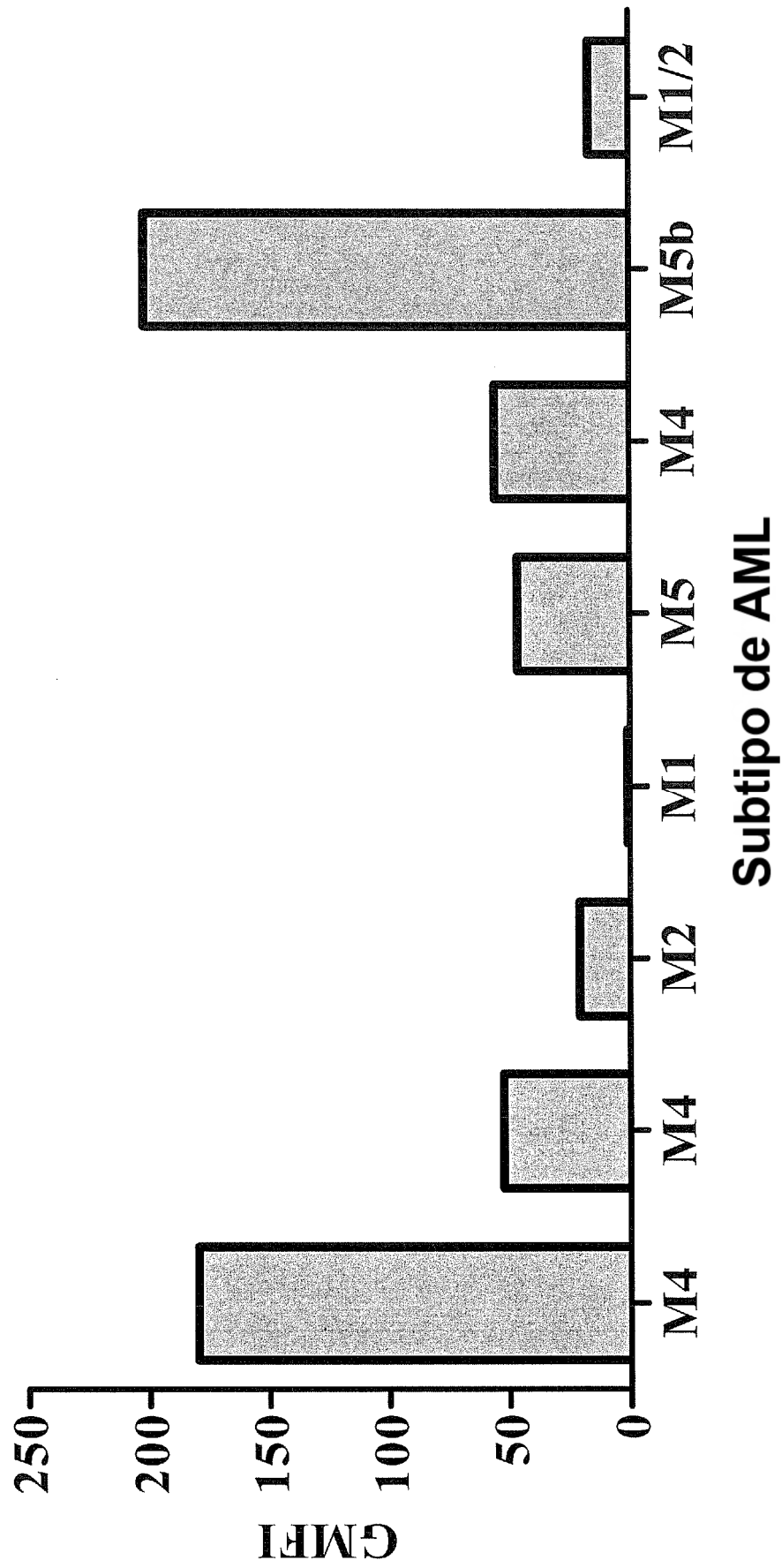
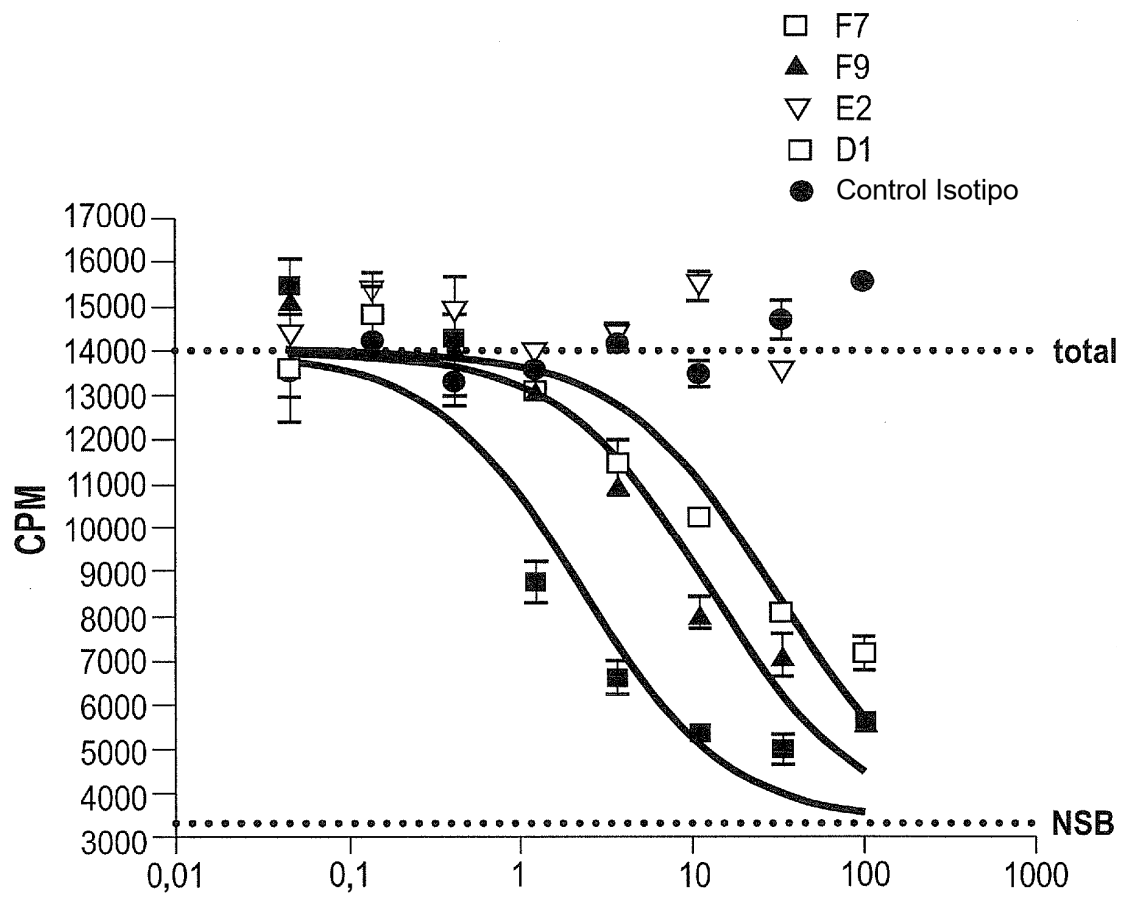


FIG. 5



| Ab en nM |       |       |       |
|----------|-------|-------|-------|
|          | F7    | F9    | D1    |
| EC50     | 2,256 | 12,51 | 28,60 |

FIG. 6A

Células CEM

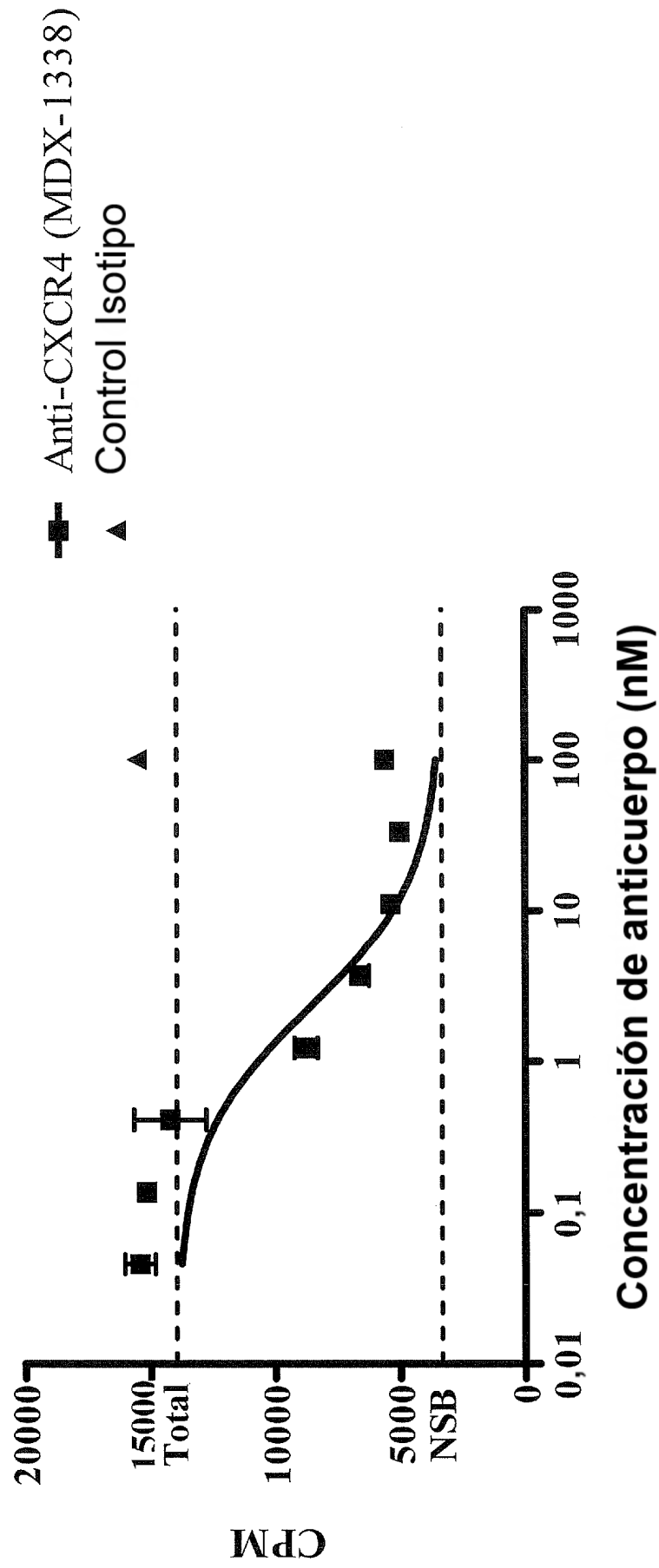


FIG. 6B

Células CEM

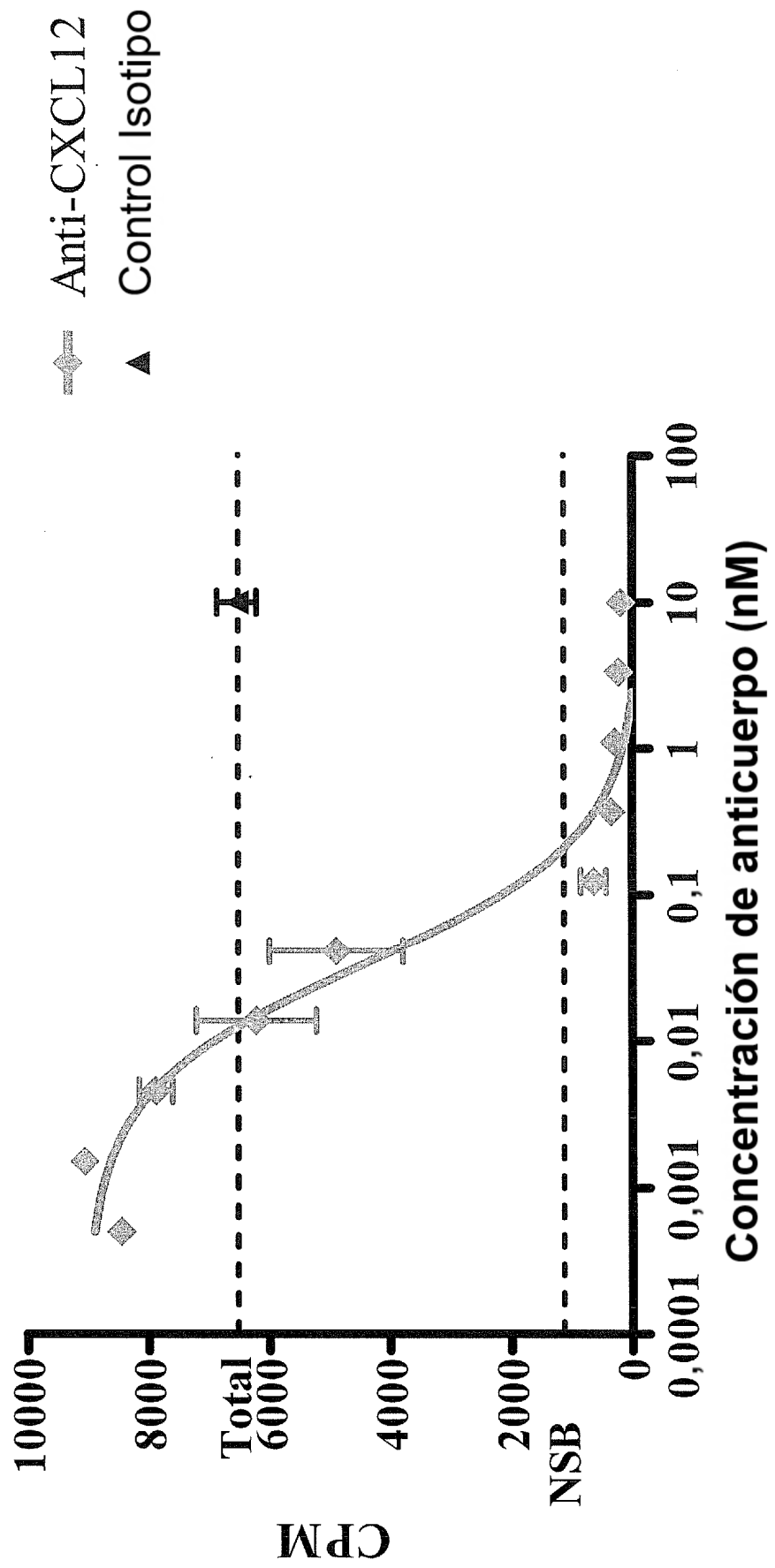


FIG. 6C

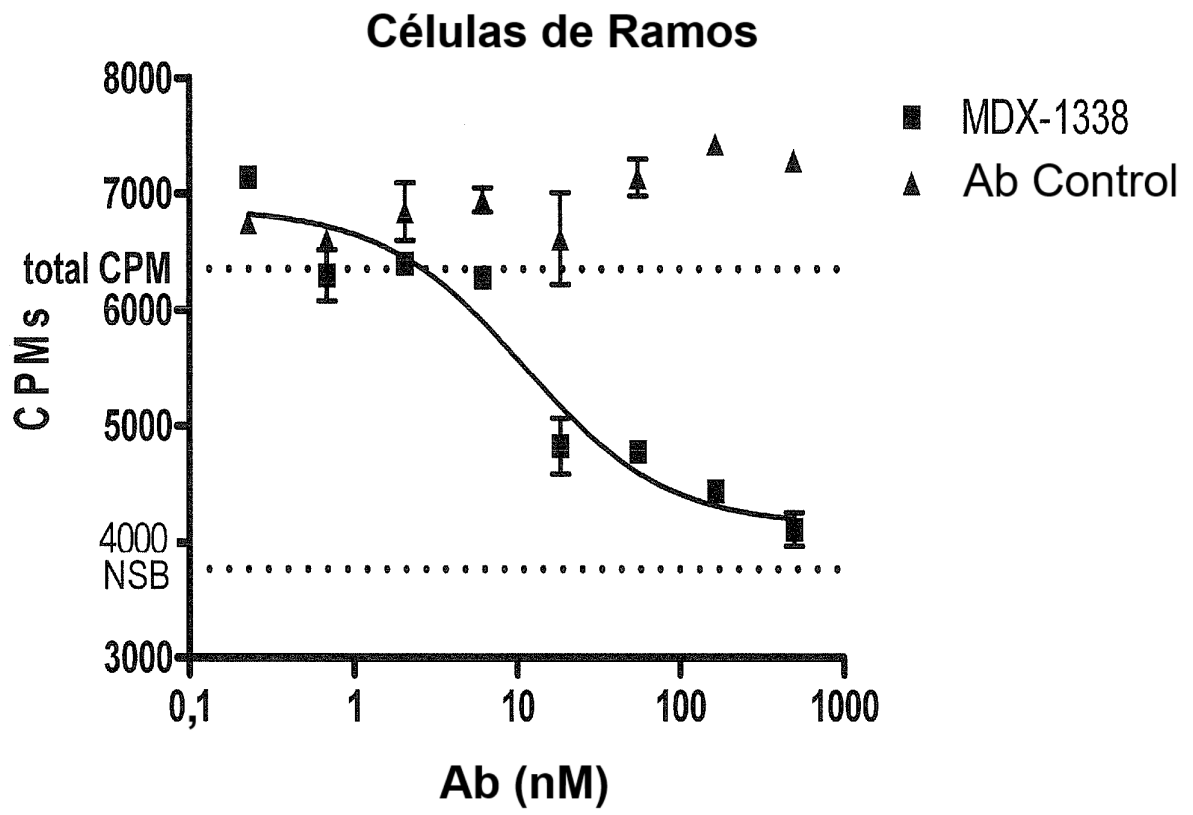
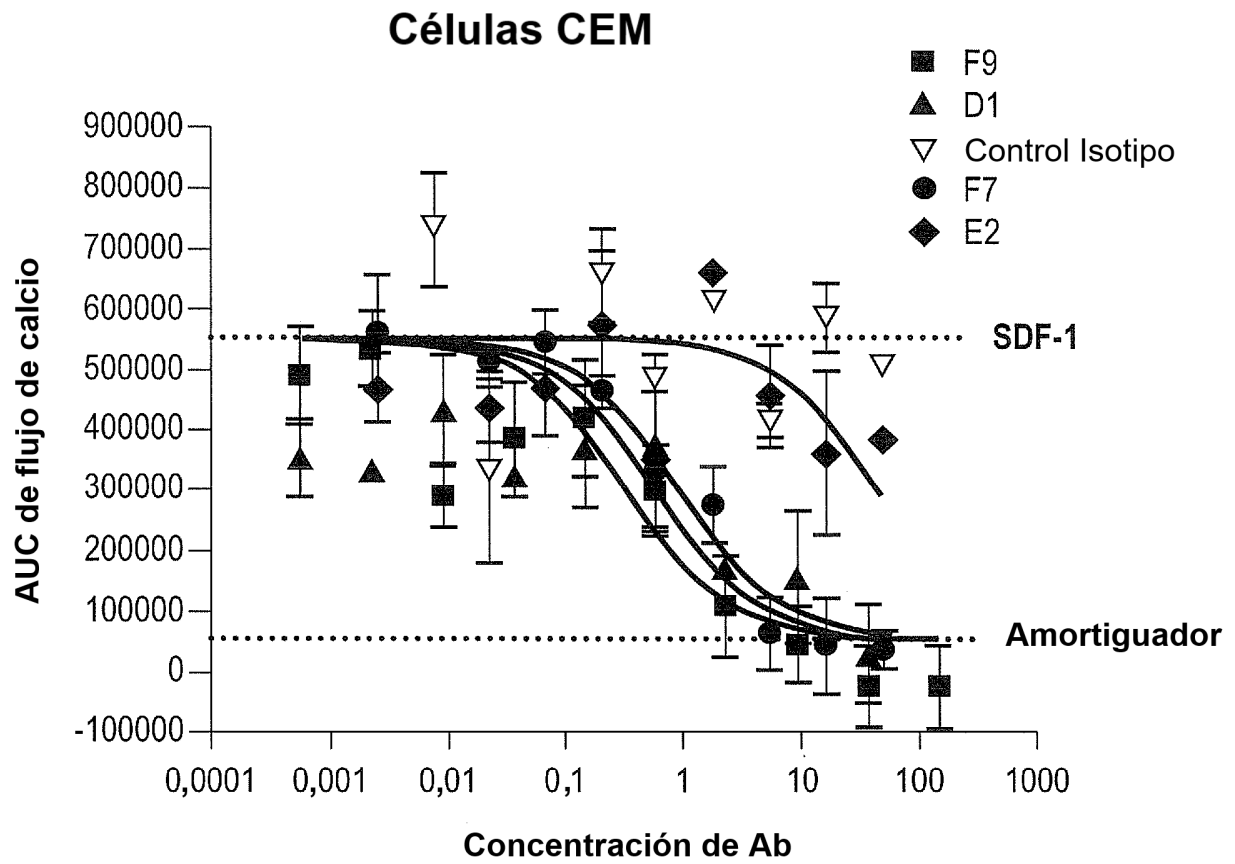


FIG. 7



|      | F9     | D1     | F7     | E2    |
|------|--------|--------|--------|-------|
| EC50 | 0,3219 | 0,5684 | 0,9046 | 43,92 |

FIG. 8A

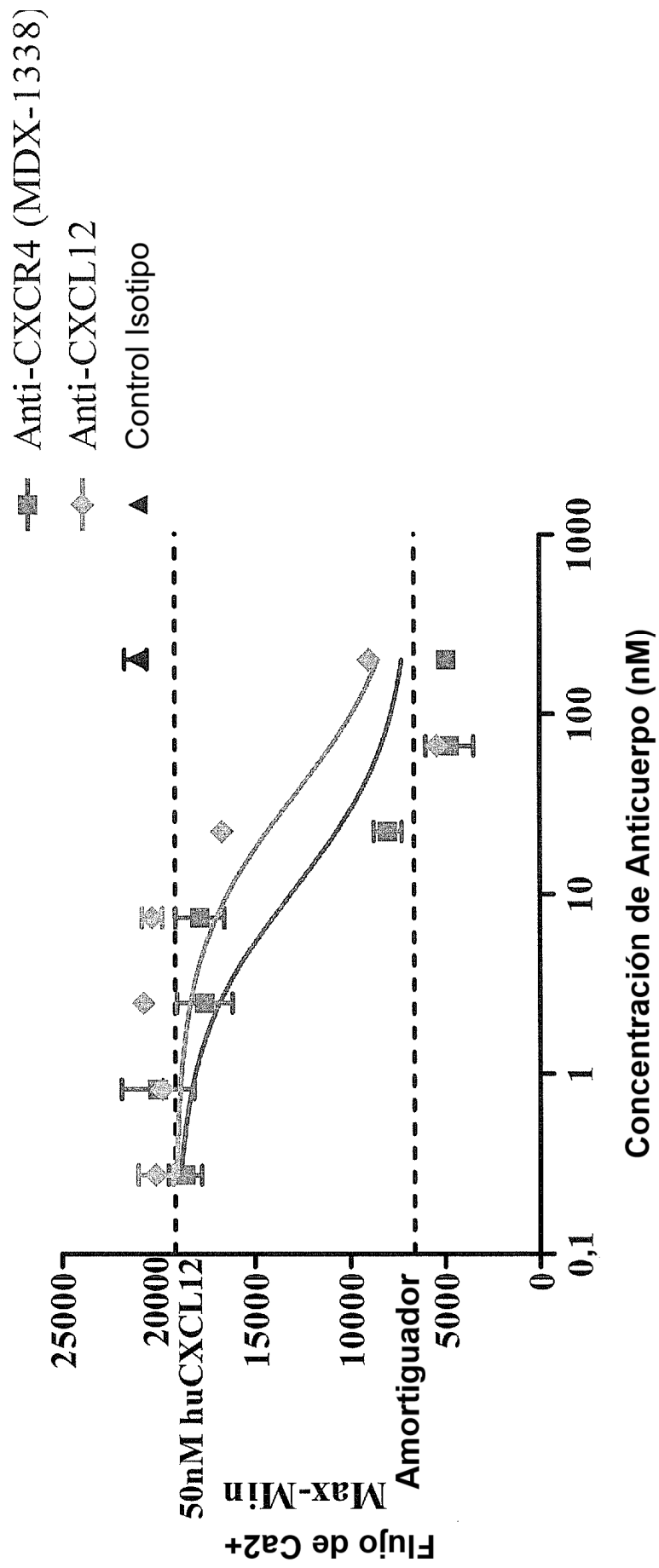


FIG. 8B

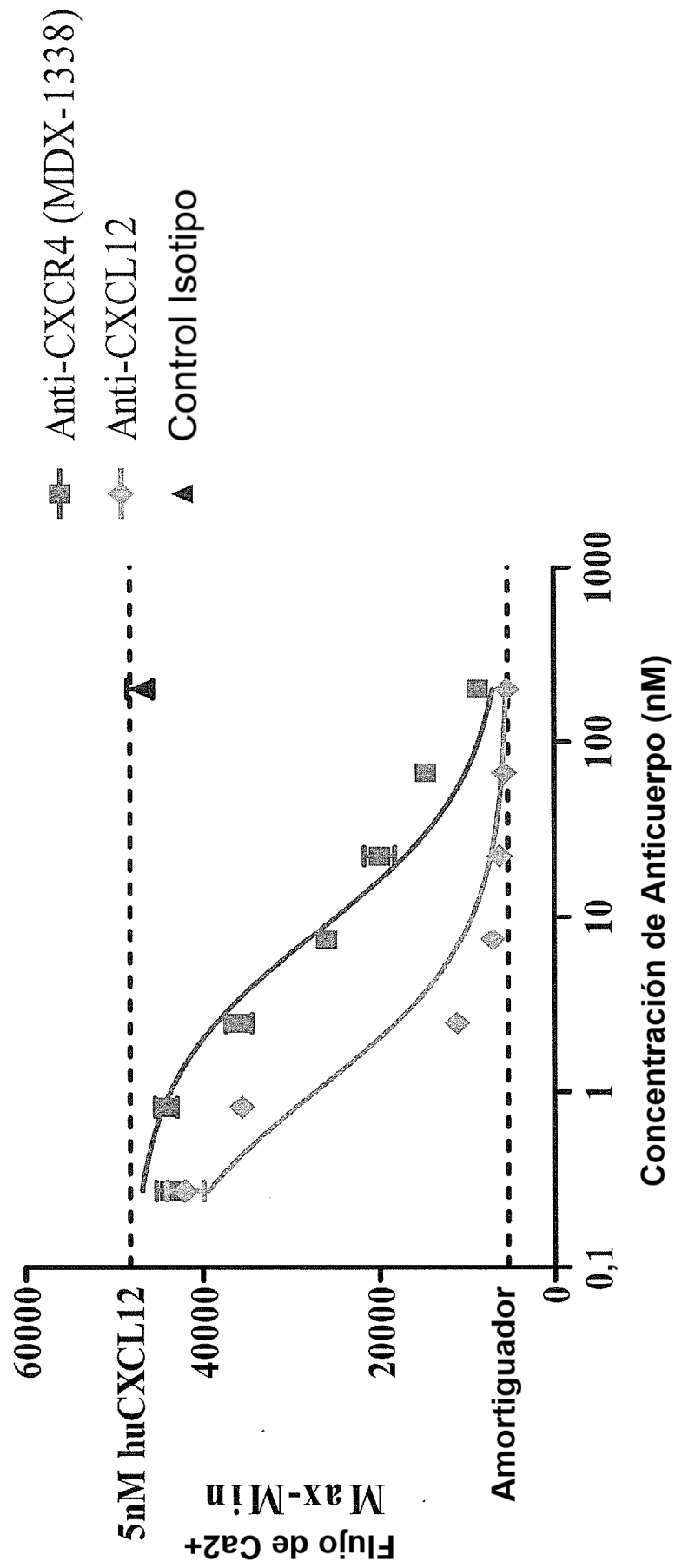
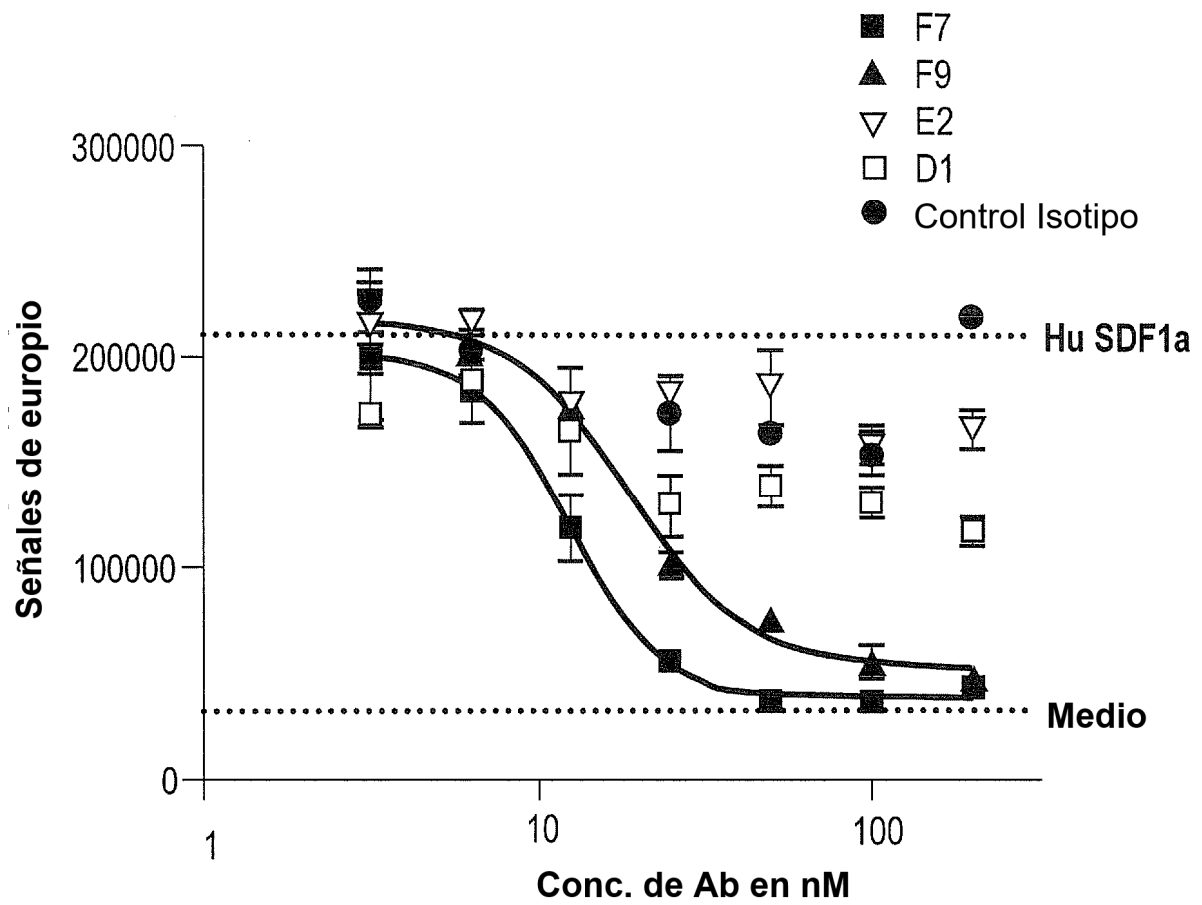


FIG. 9



|      | F7    | F9    |
|------|-------|-------|
| EC50 | 12,44 | 18,99 |

FIG. 10A

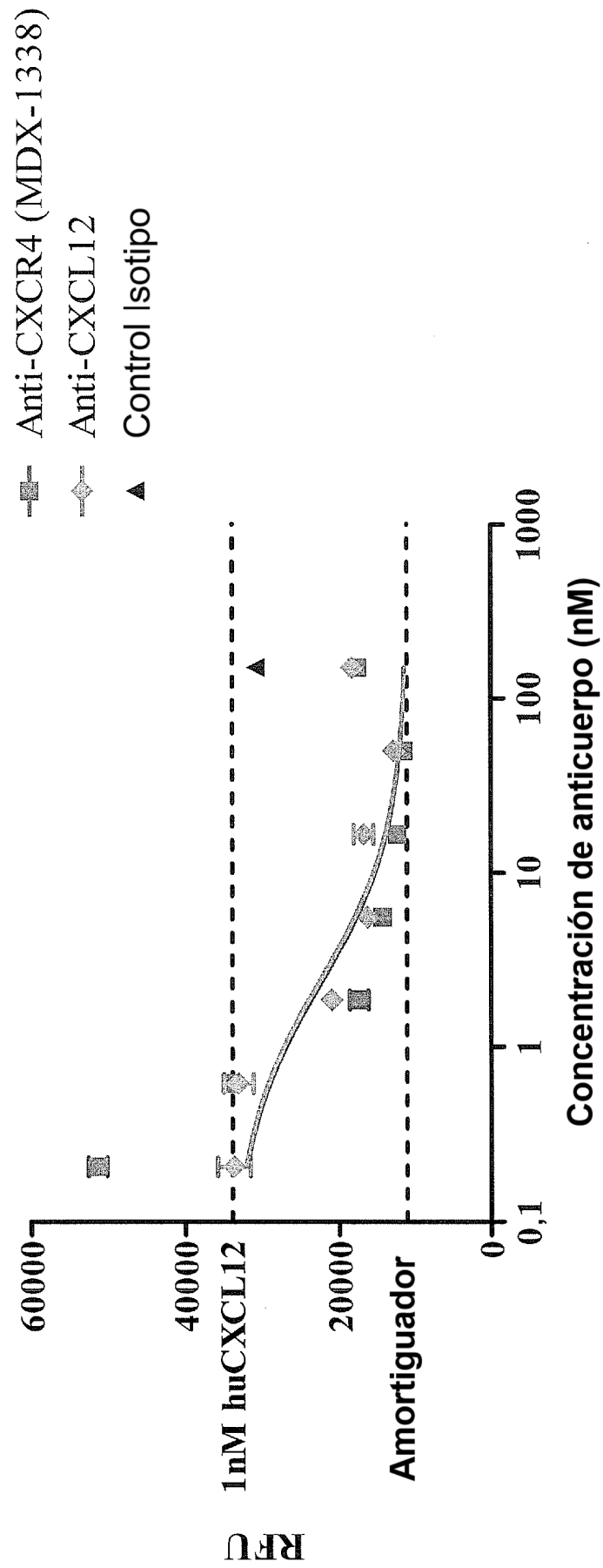


FIG. 10B

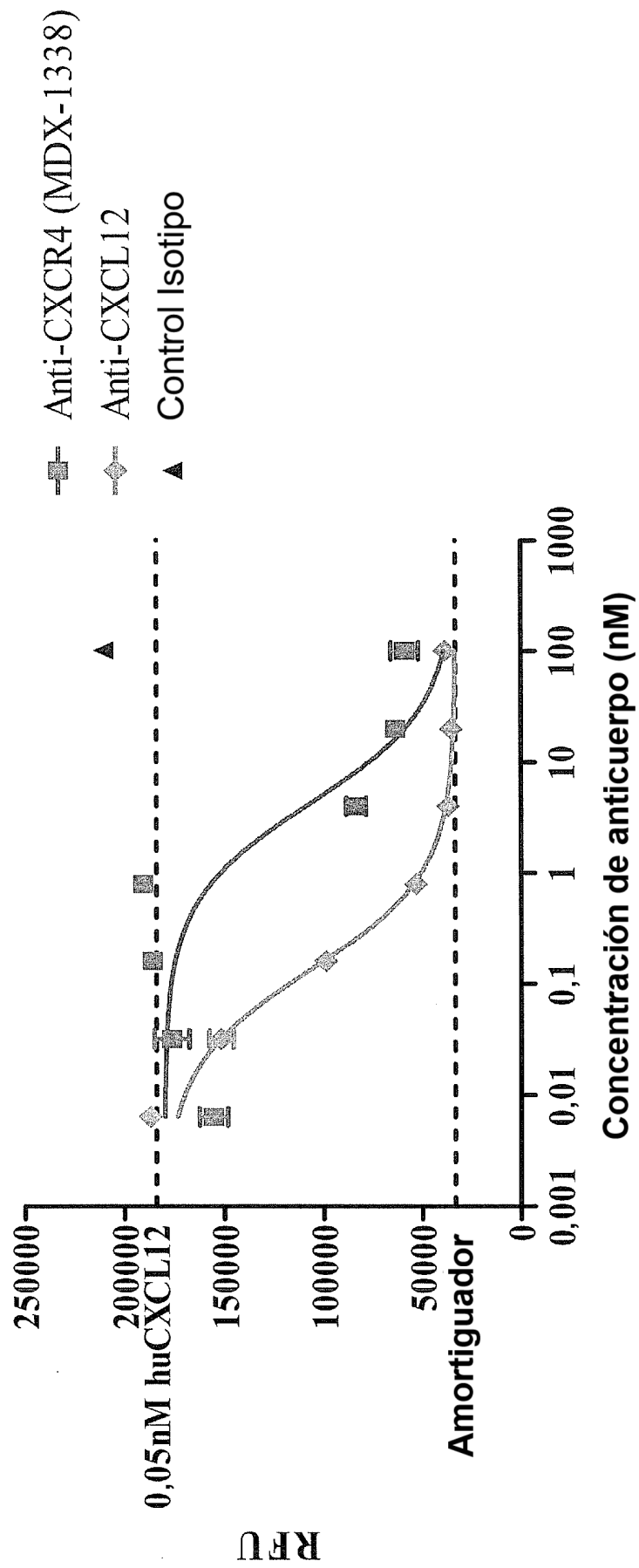


FIG. 11A

Ensayo de proliferación de 72 h de Ramos

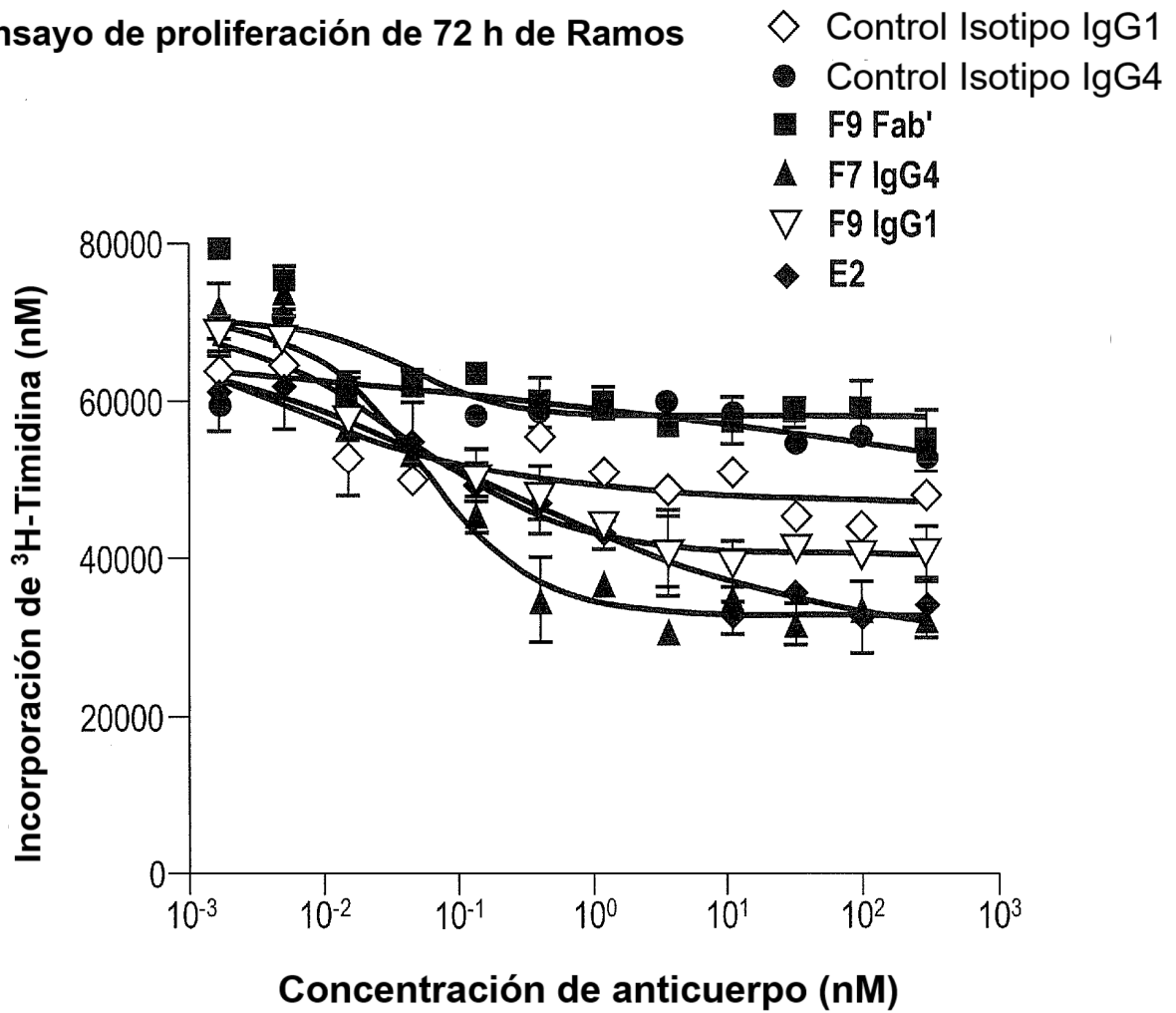


FIG. 11B

**Proliferación de Células Ramos**

Abs: 41,25nM

Péptidos: 100uM

CPT: 10uM

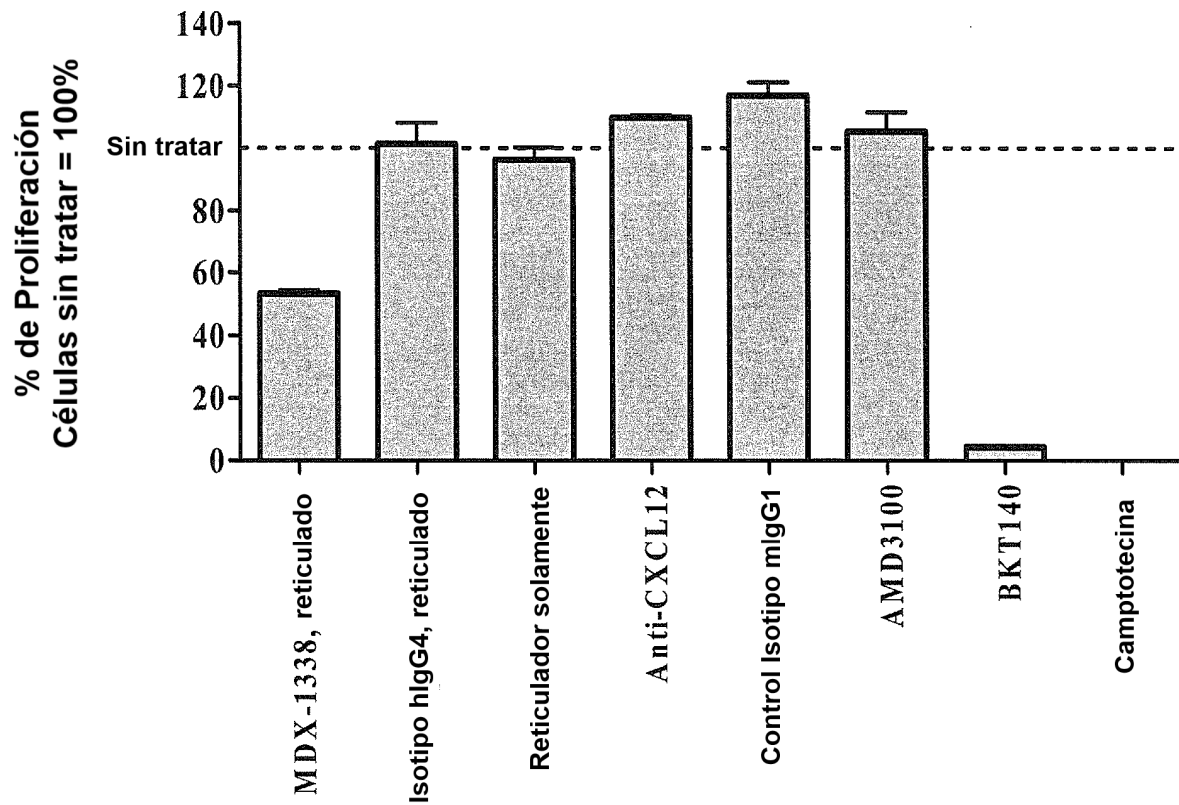


FIG. 12A

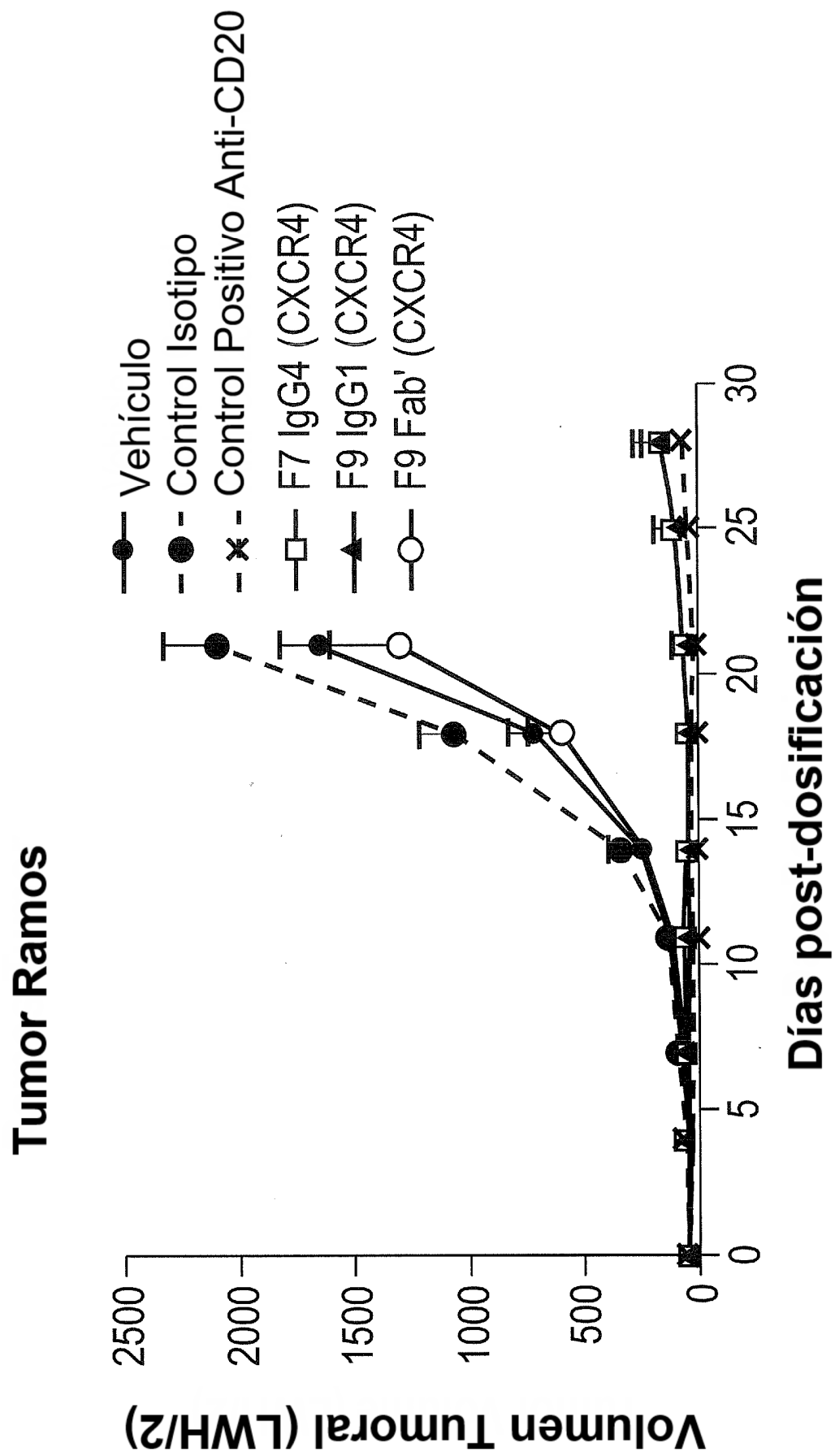


FIG. 12B

# Tumor Ramos

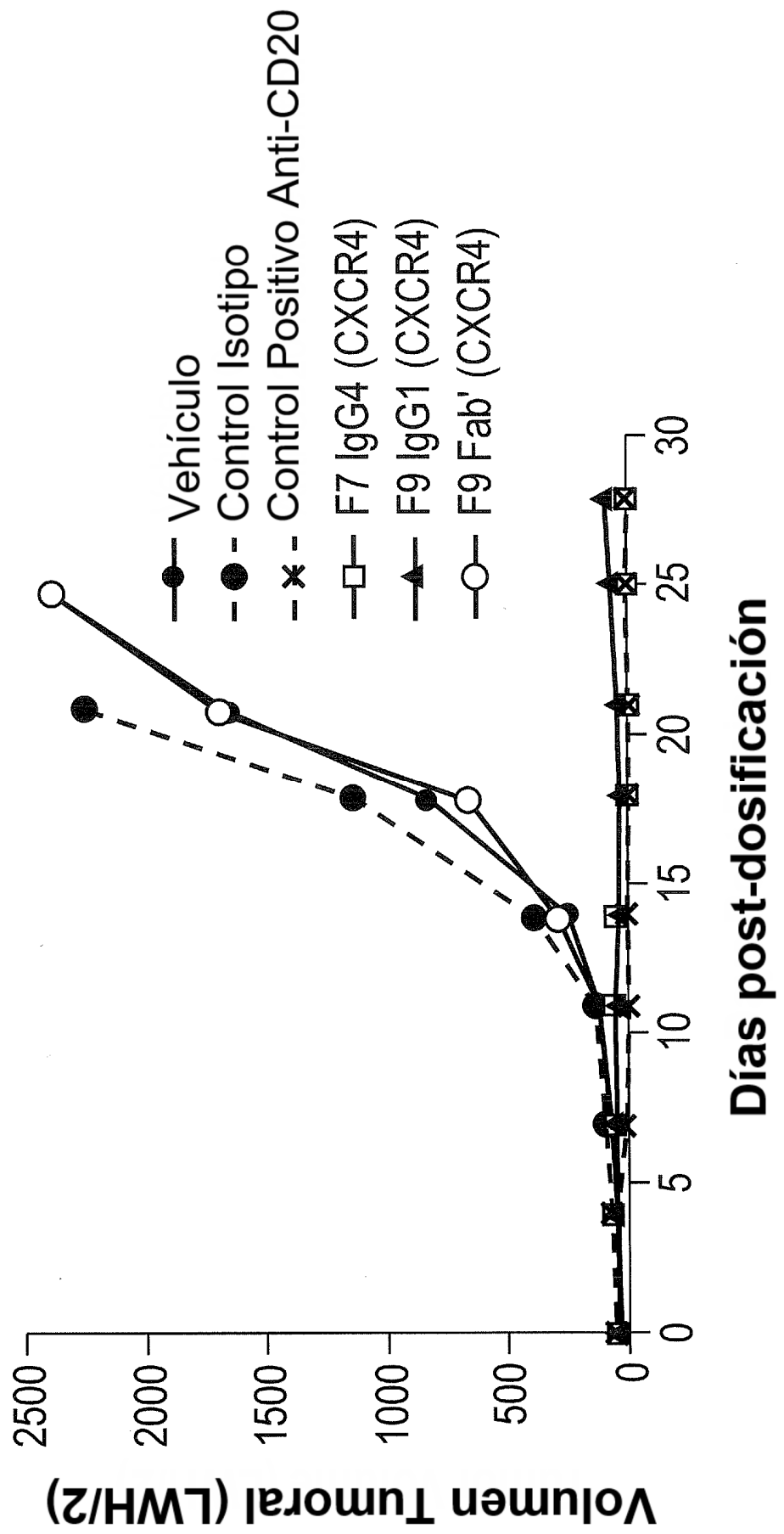


FIG. 12C

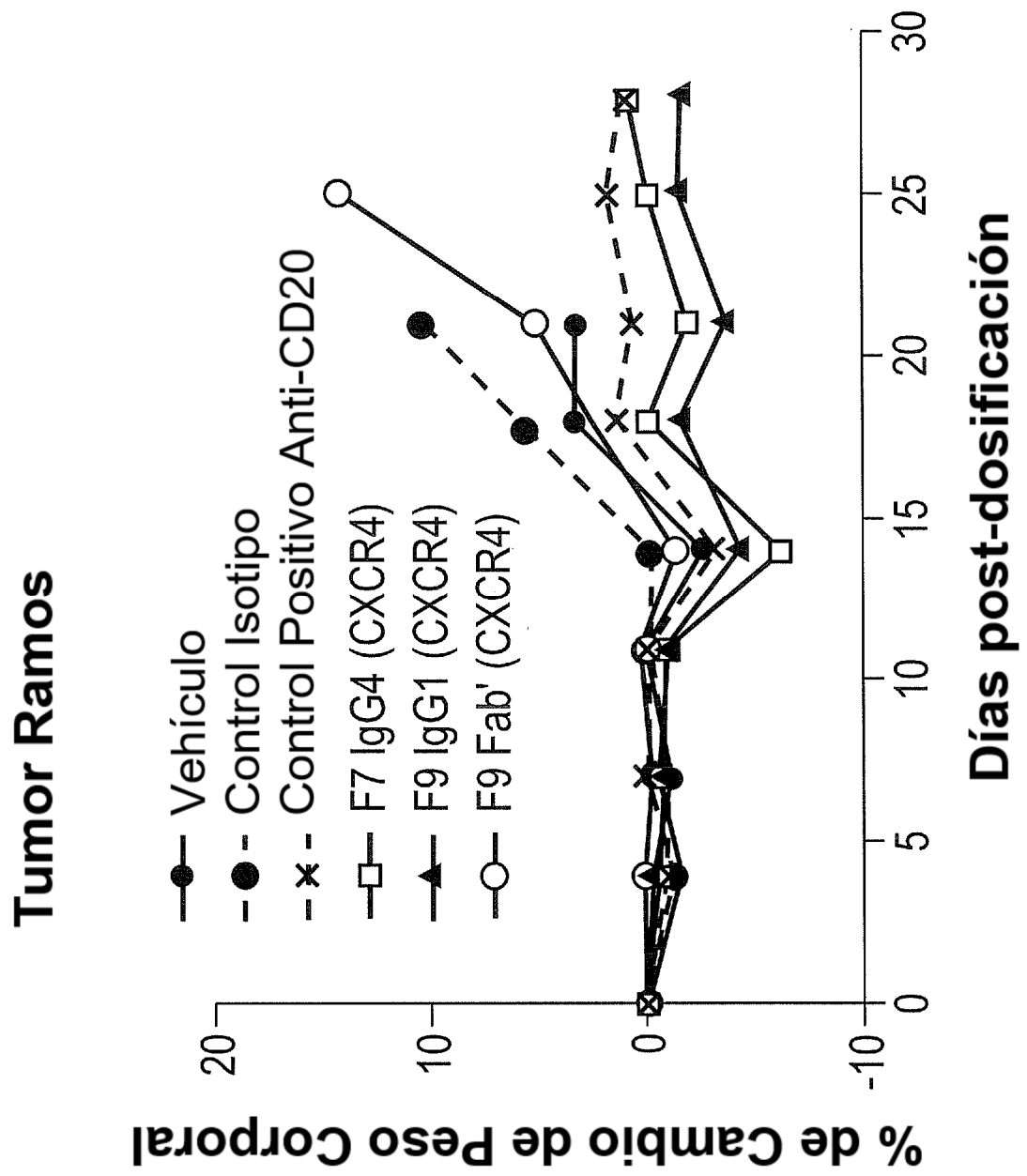


FIG. 13A

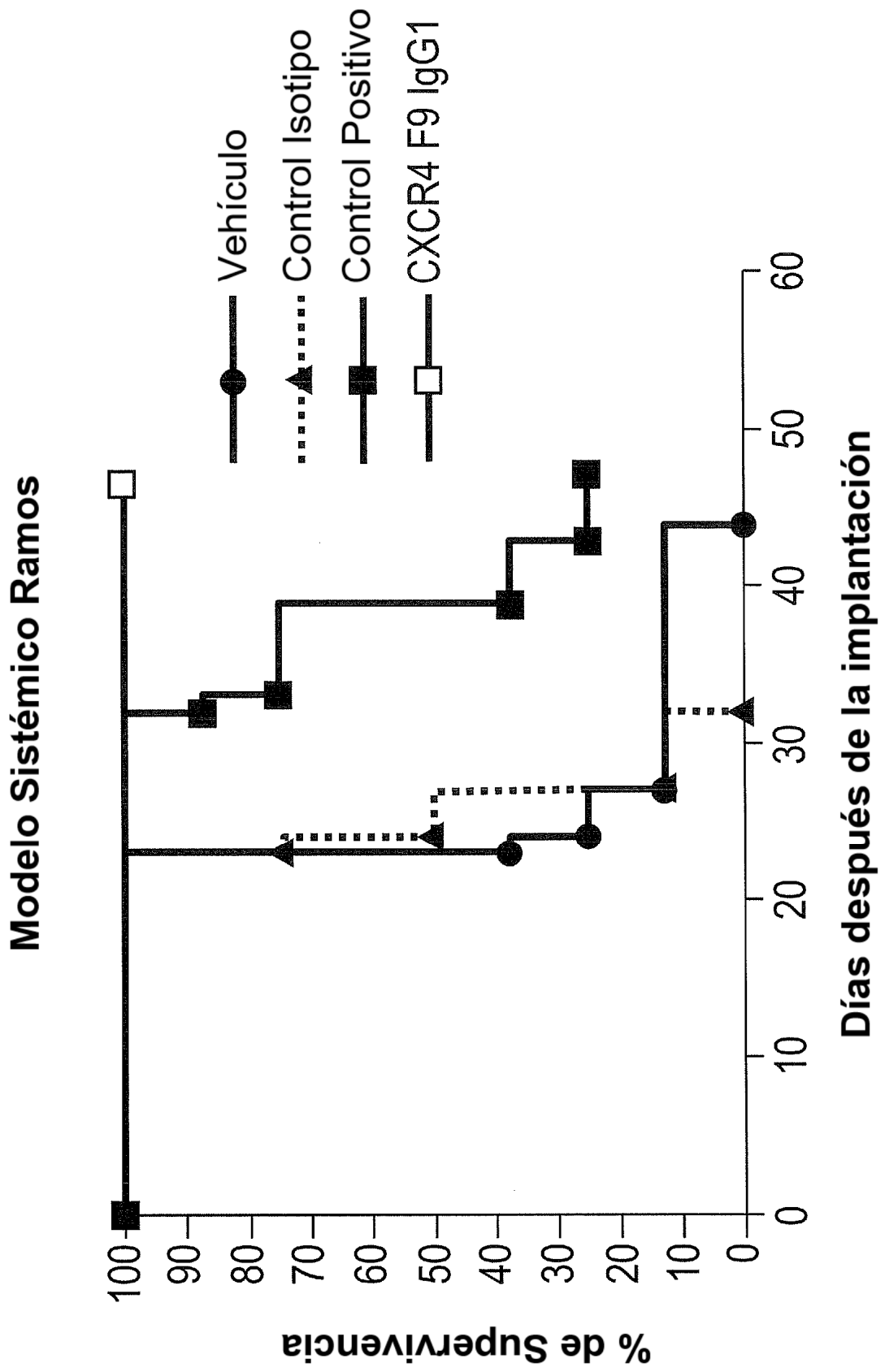


FIG. 13B

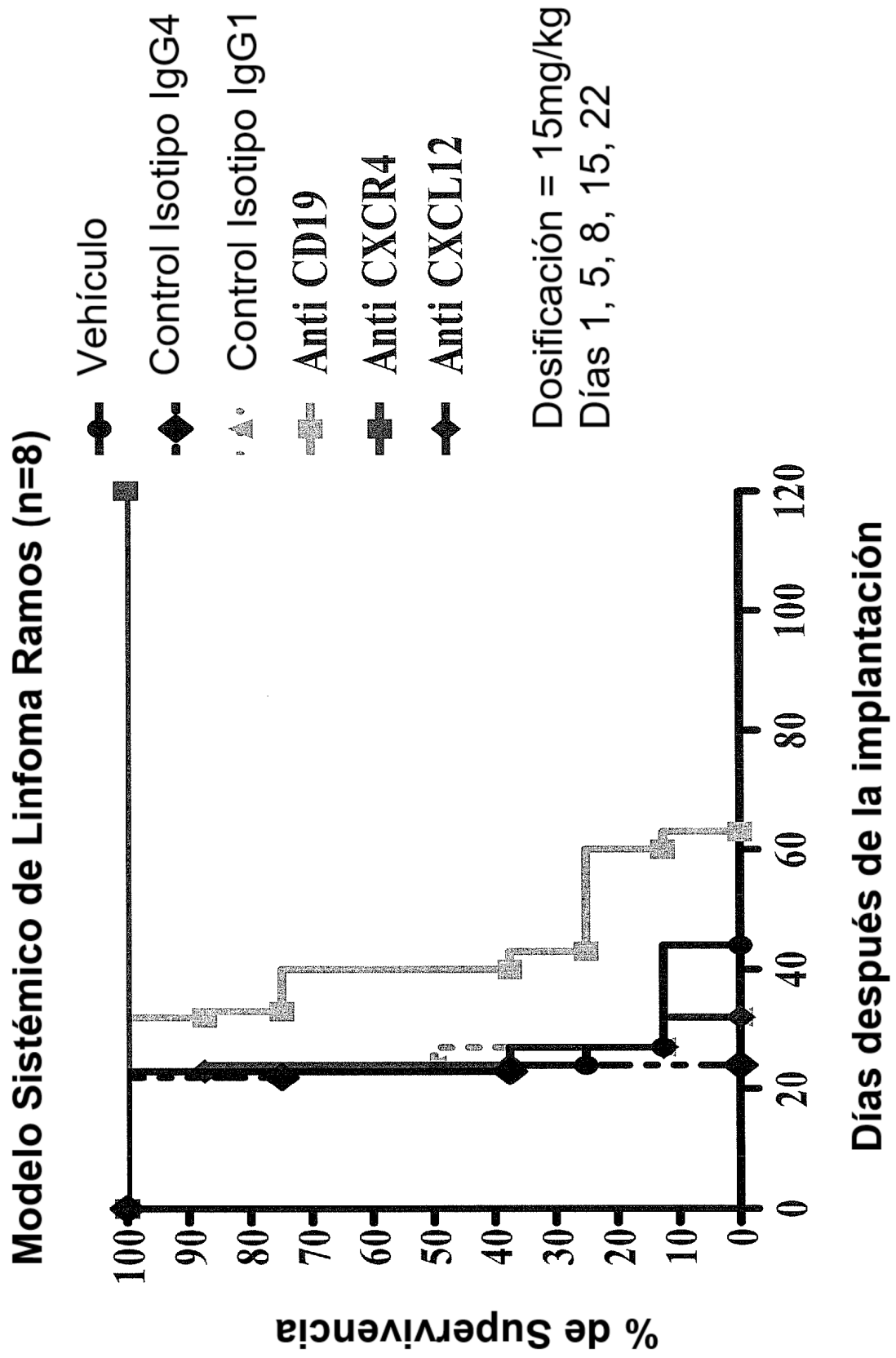
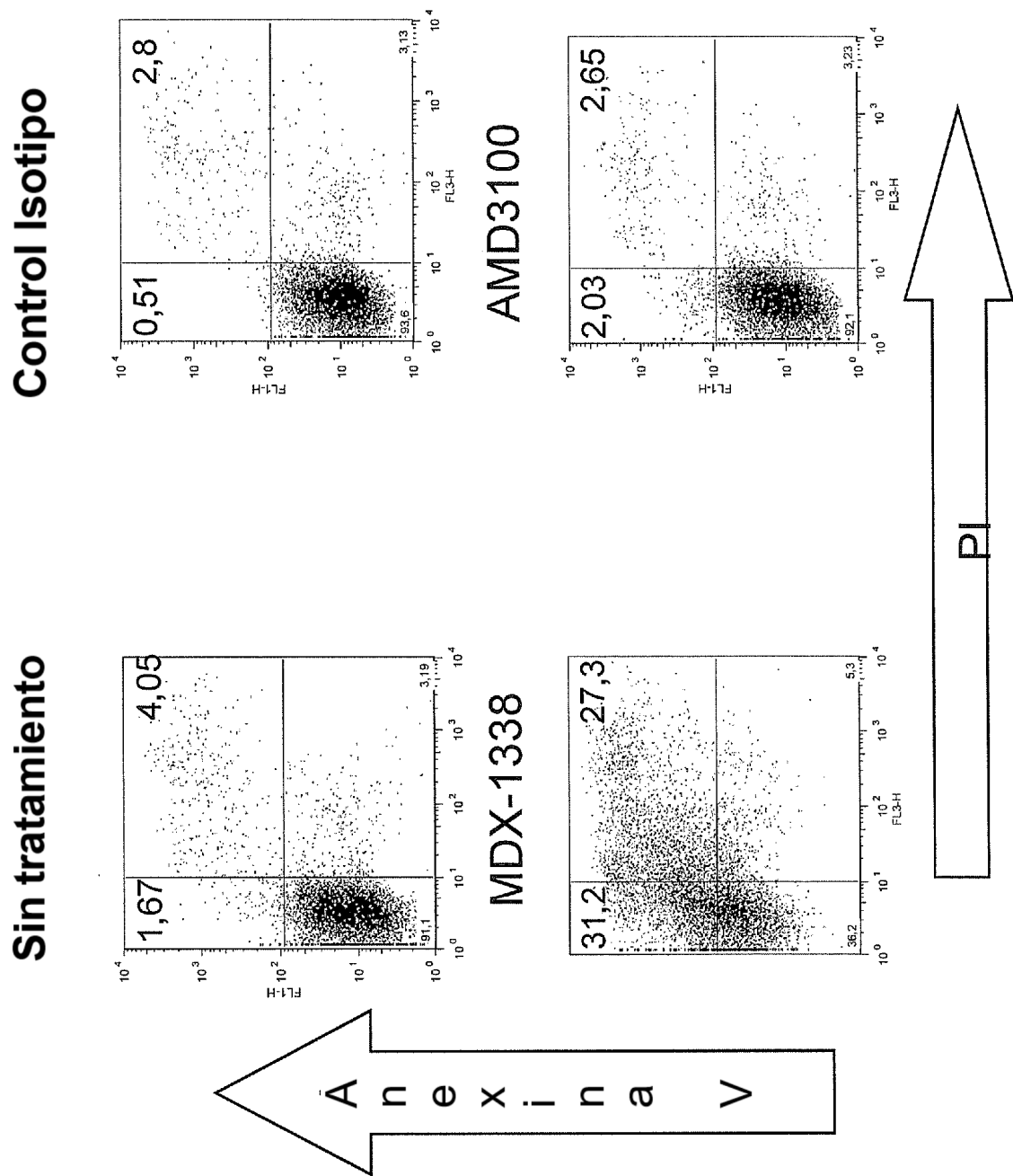


FIG. 14A



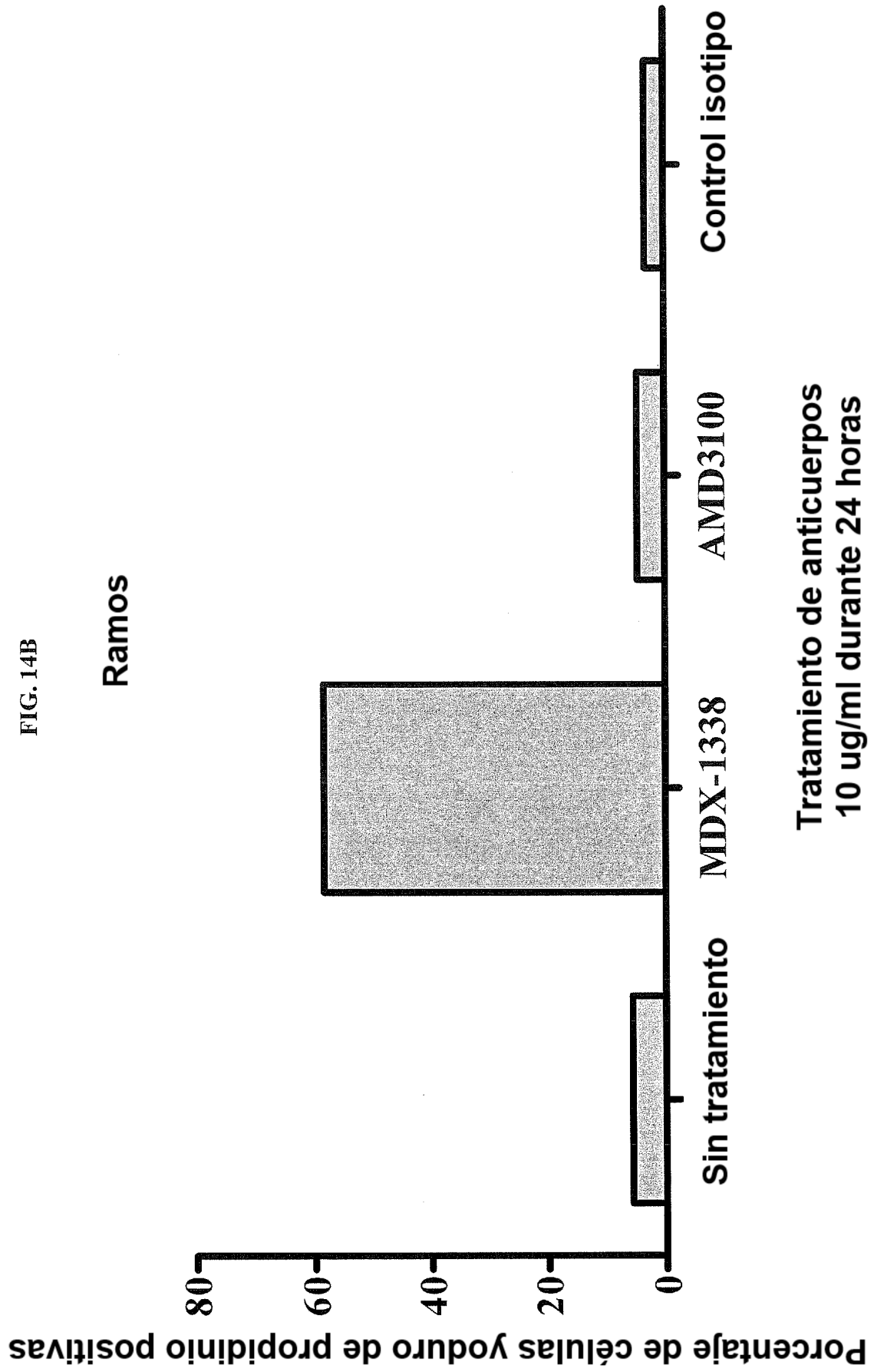


FIG. 15A

**Células R1610-CXCR4**

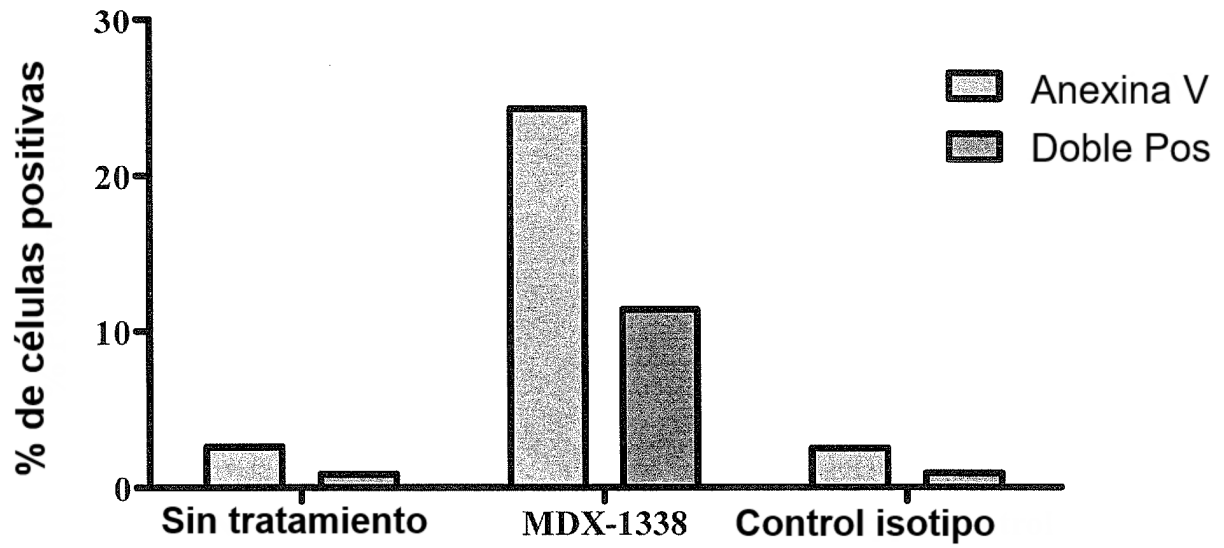
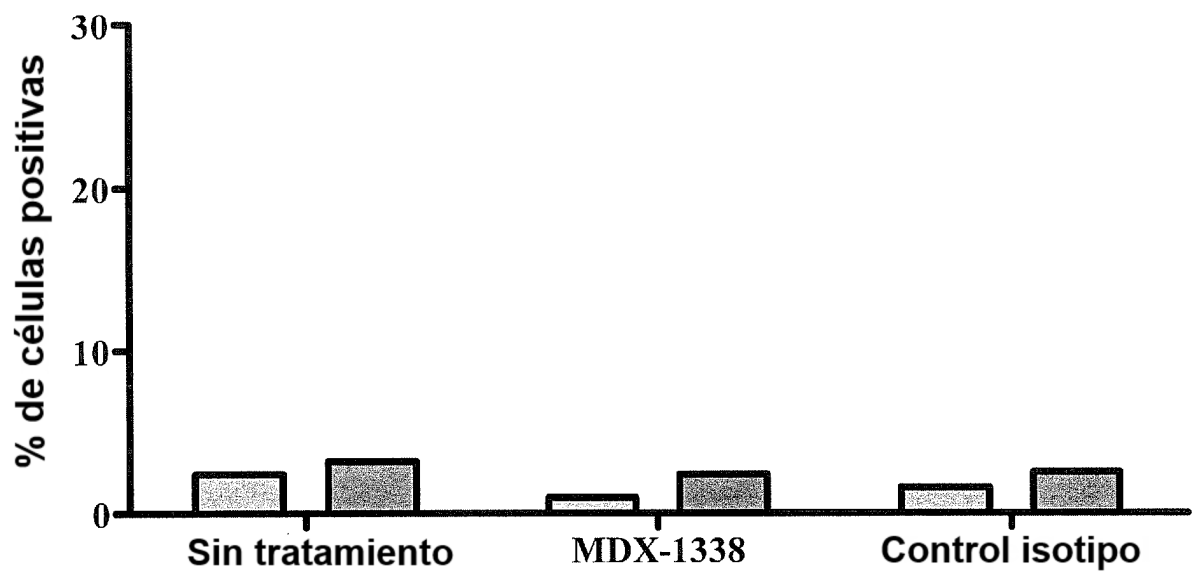


FIG. 15B

**Células R1610**



**FIG. 16**  
**Xenoinjerto de linfoma de Células B Ramos**

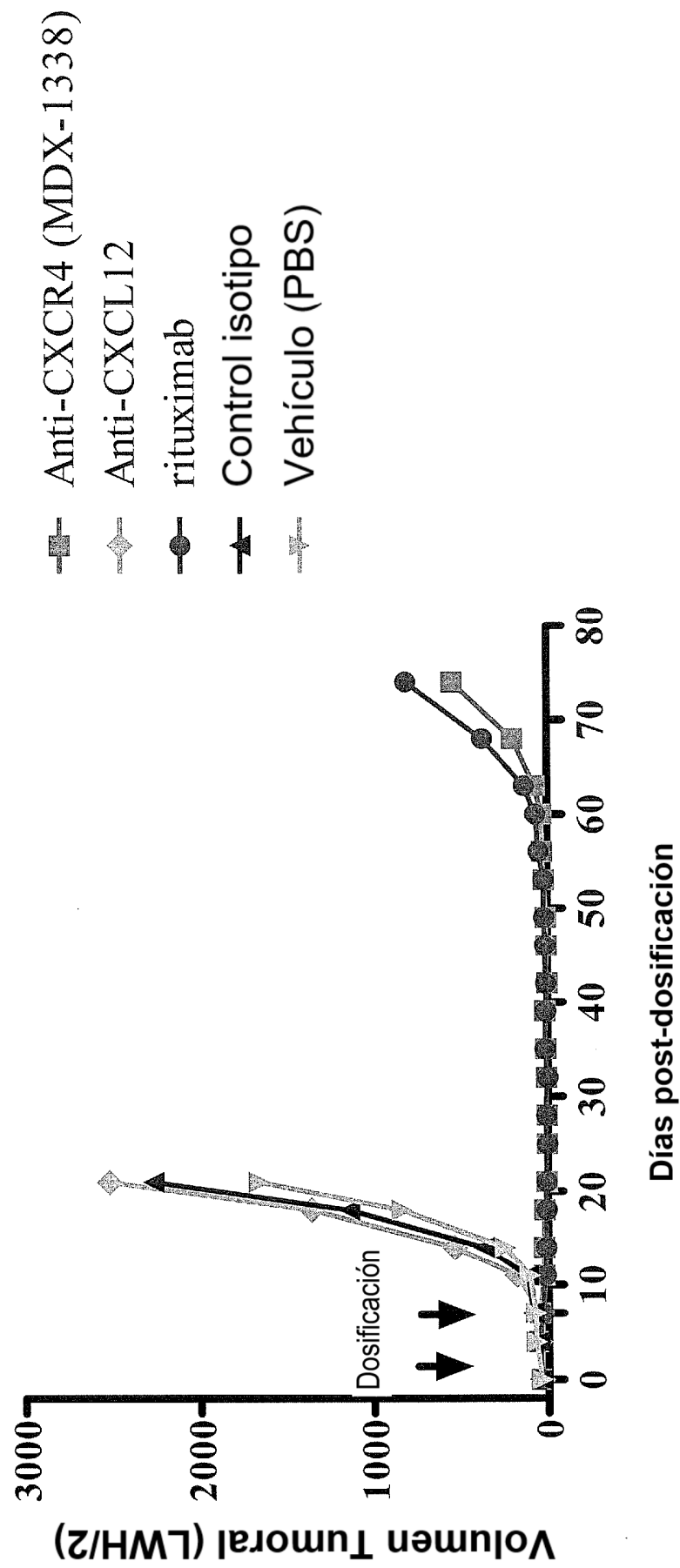


FIG. 17A

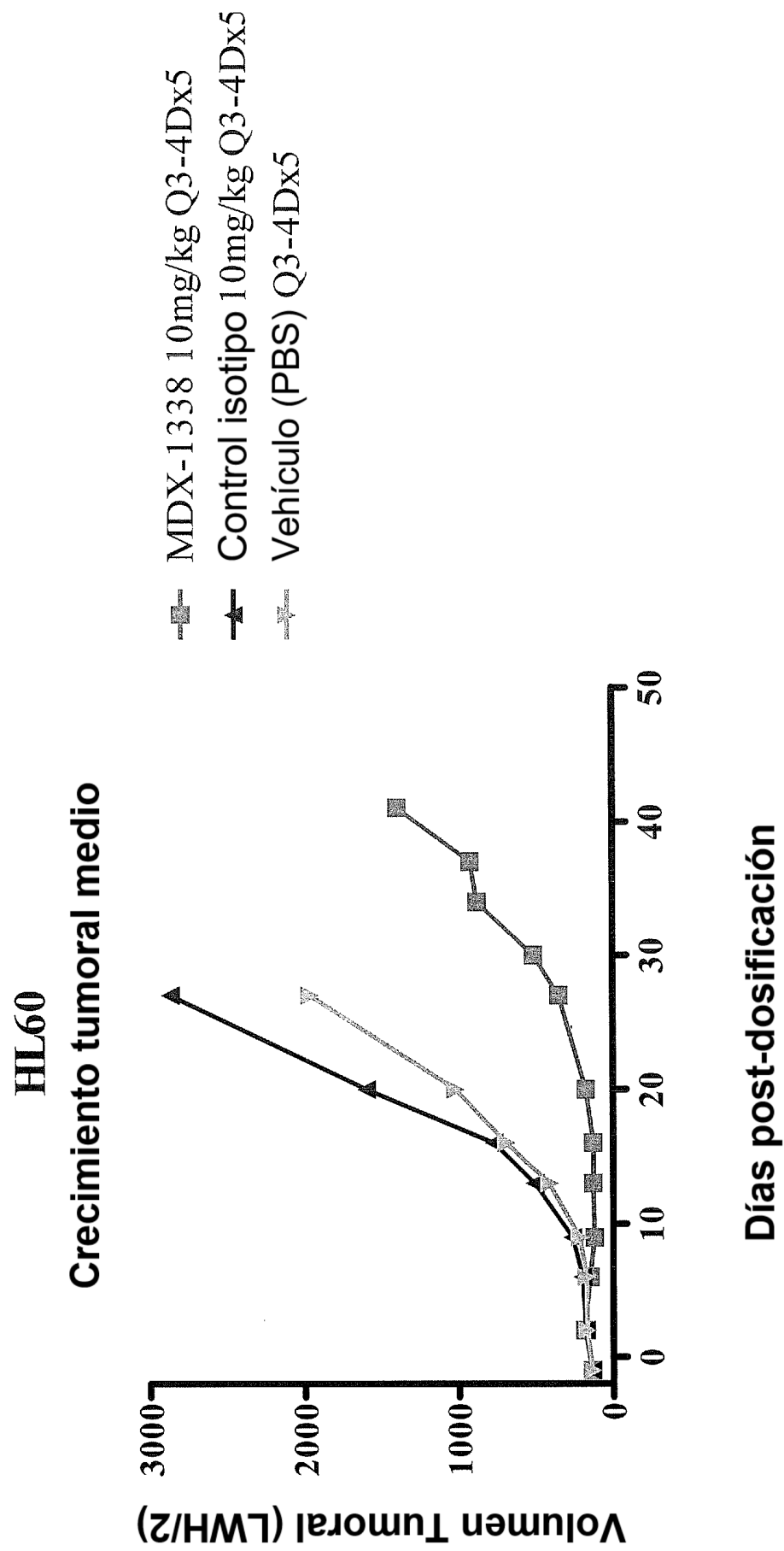


FIG. 17B

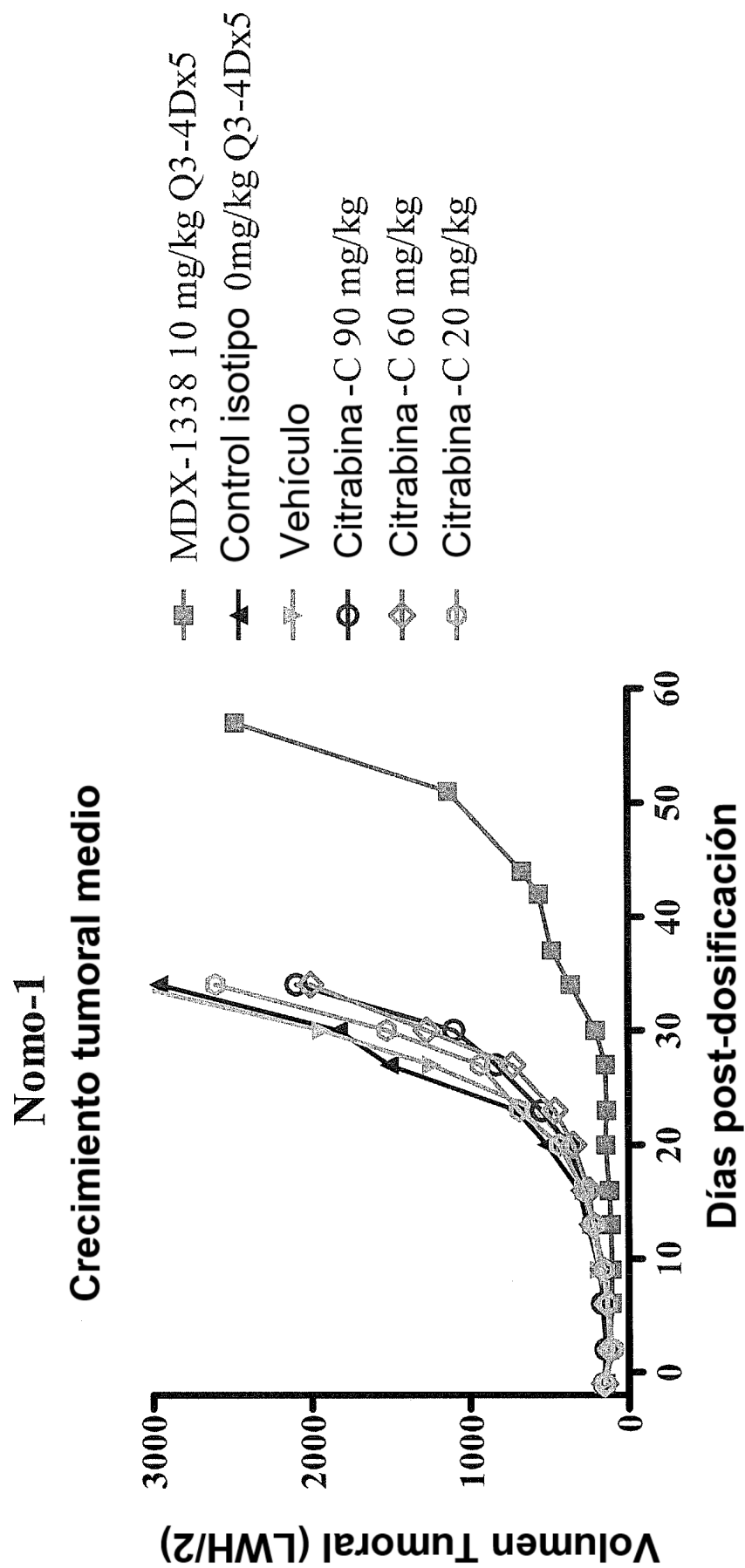


FIG. 18A

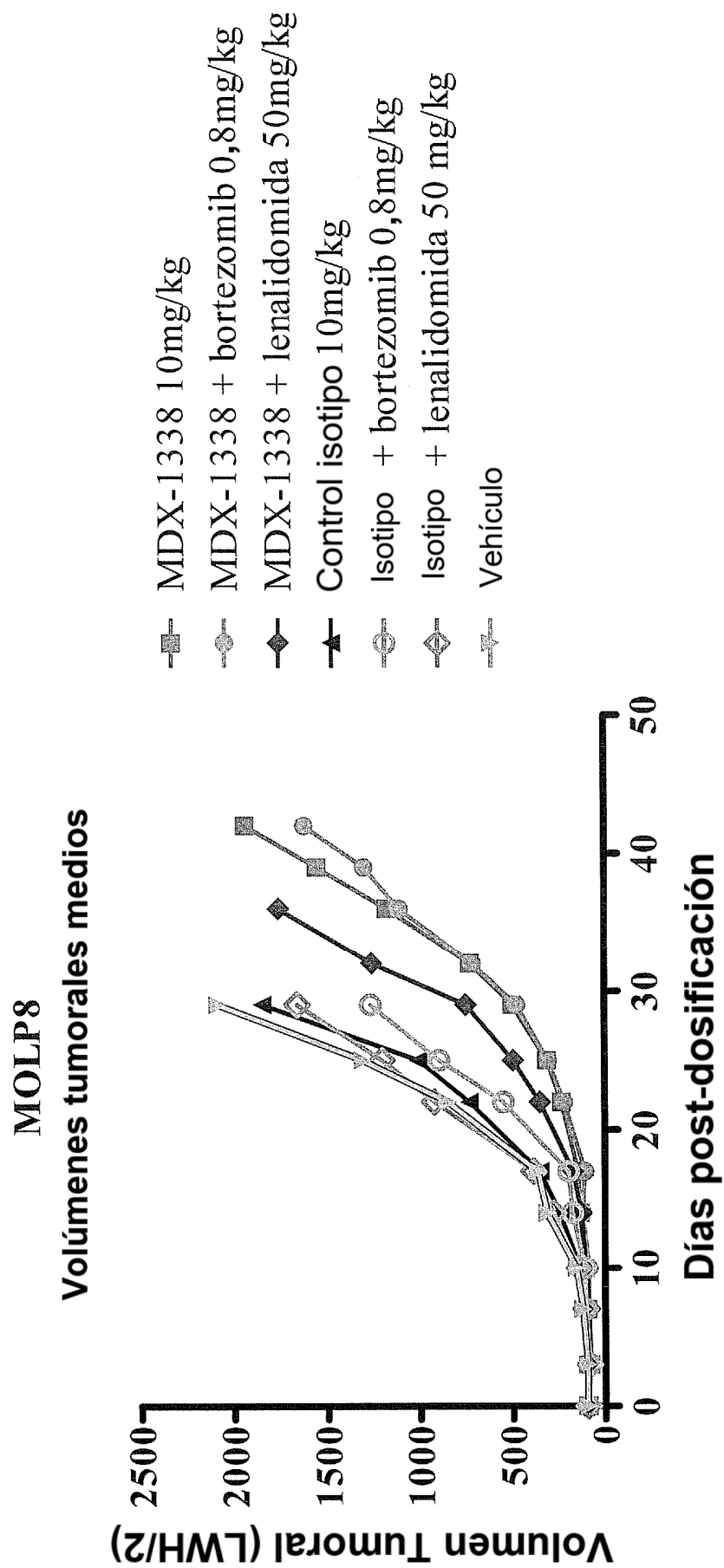


FIG. 18B

# JJN3-R

Volúmenes tumorales medios

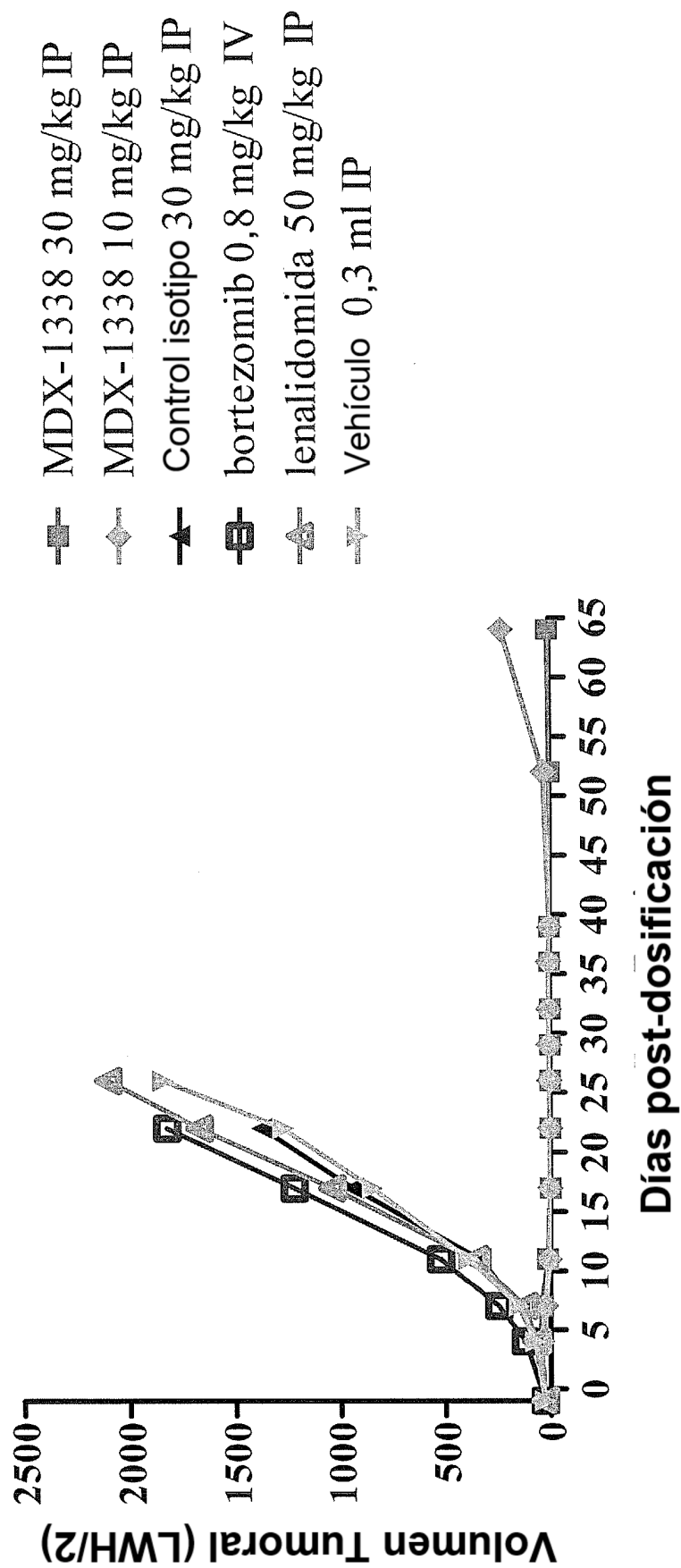


FIG. 18C

JJN-3 Volúmenes tumorales medios

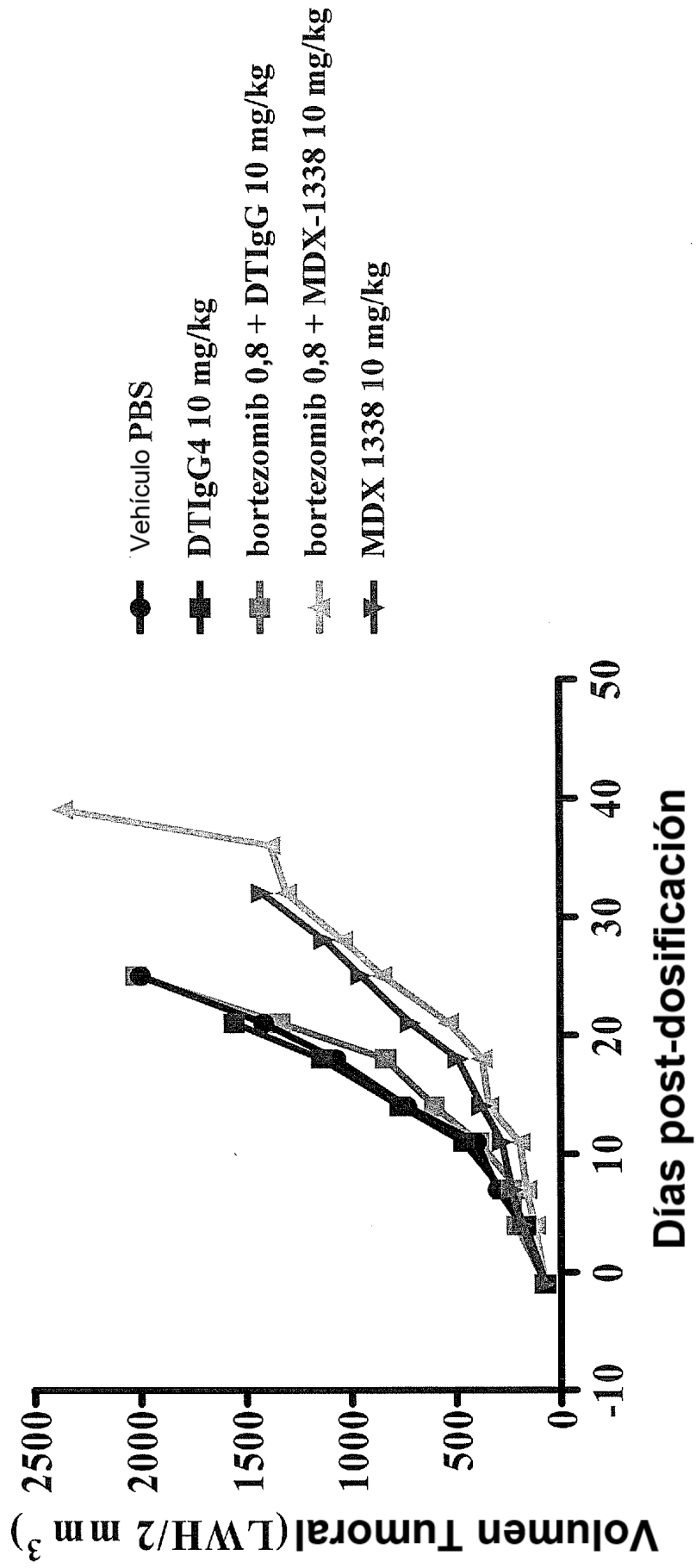


FIG. 18D

# JJN-3 Volúmenes tumorales medios

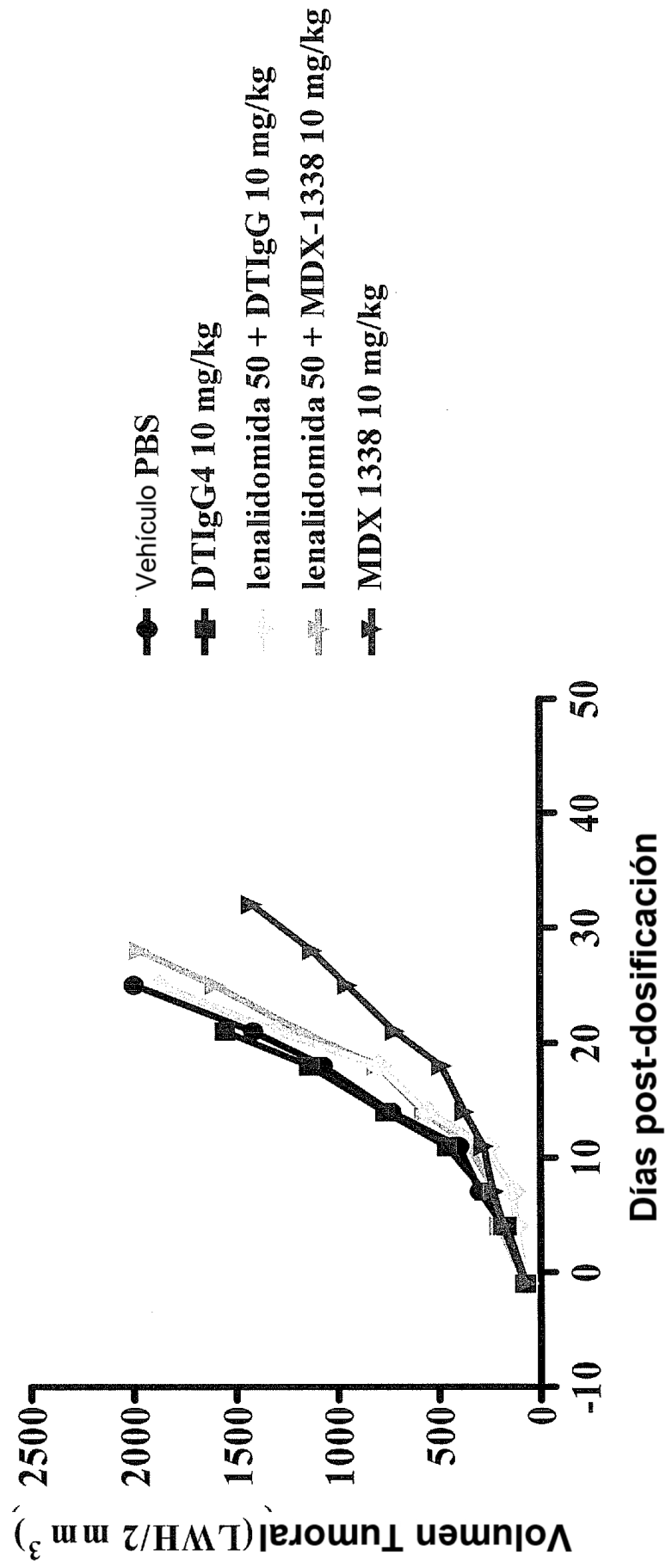


FIG. 18E

MDX-1338-050 RPMI-8226 Volúmenes tumorales medios

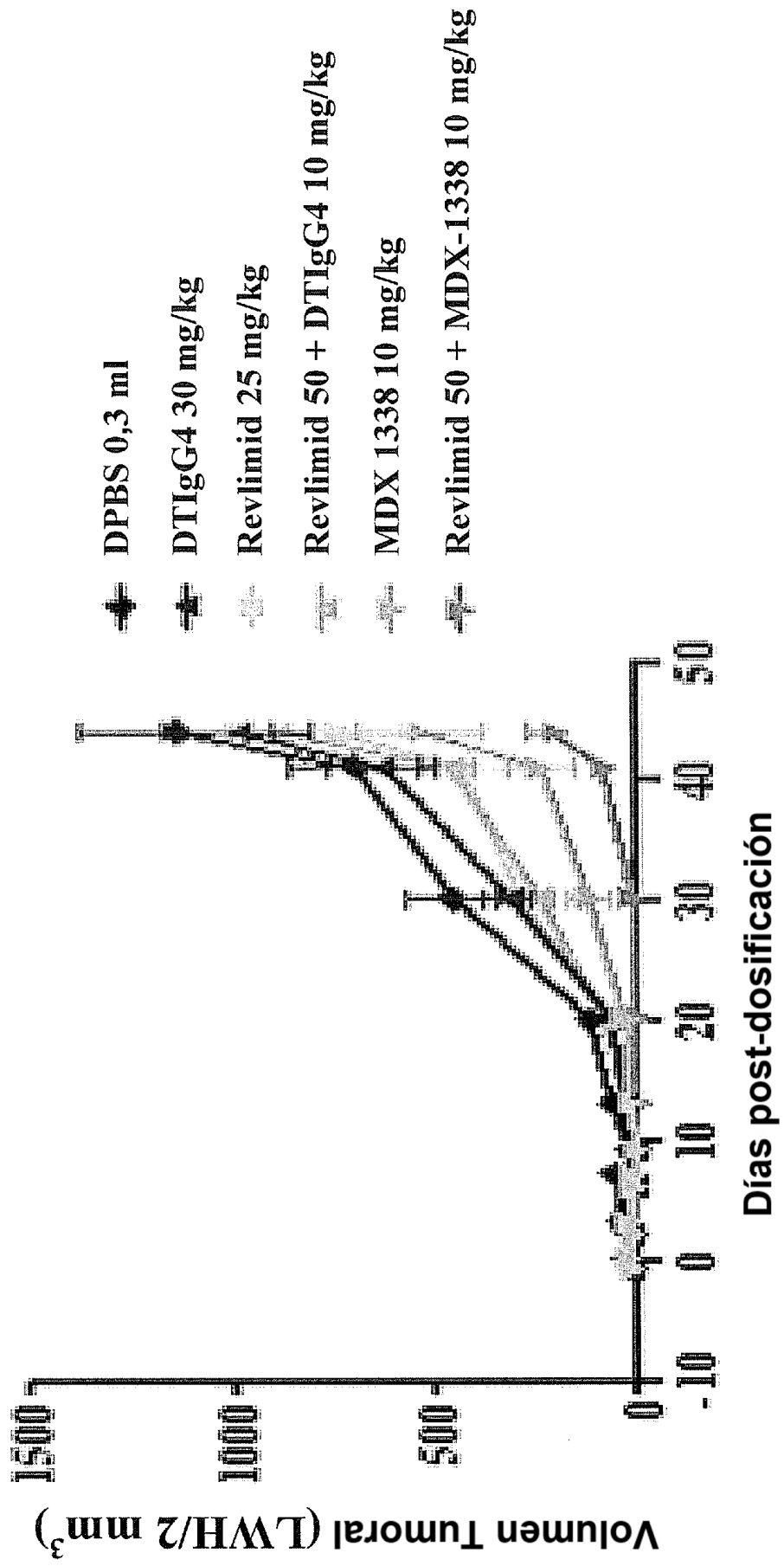


FIG. 18F

MDX-1338-050 RPMI-8226 Volúmenes tumorales medios

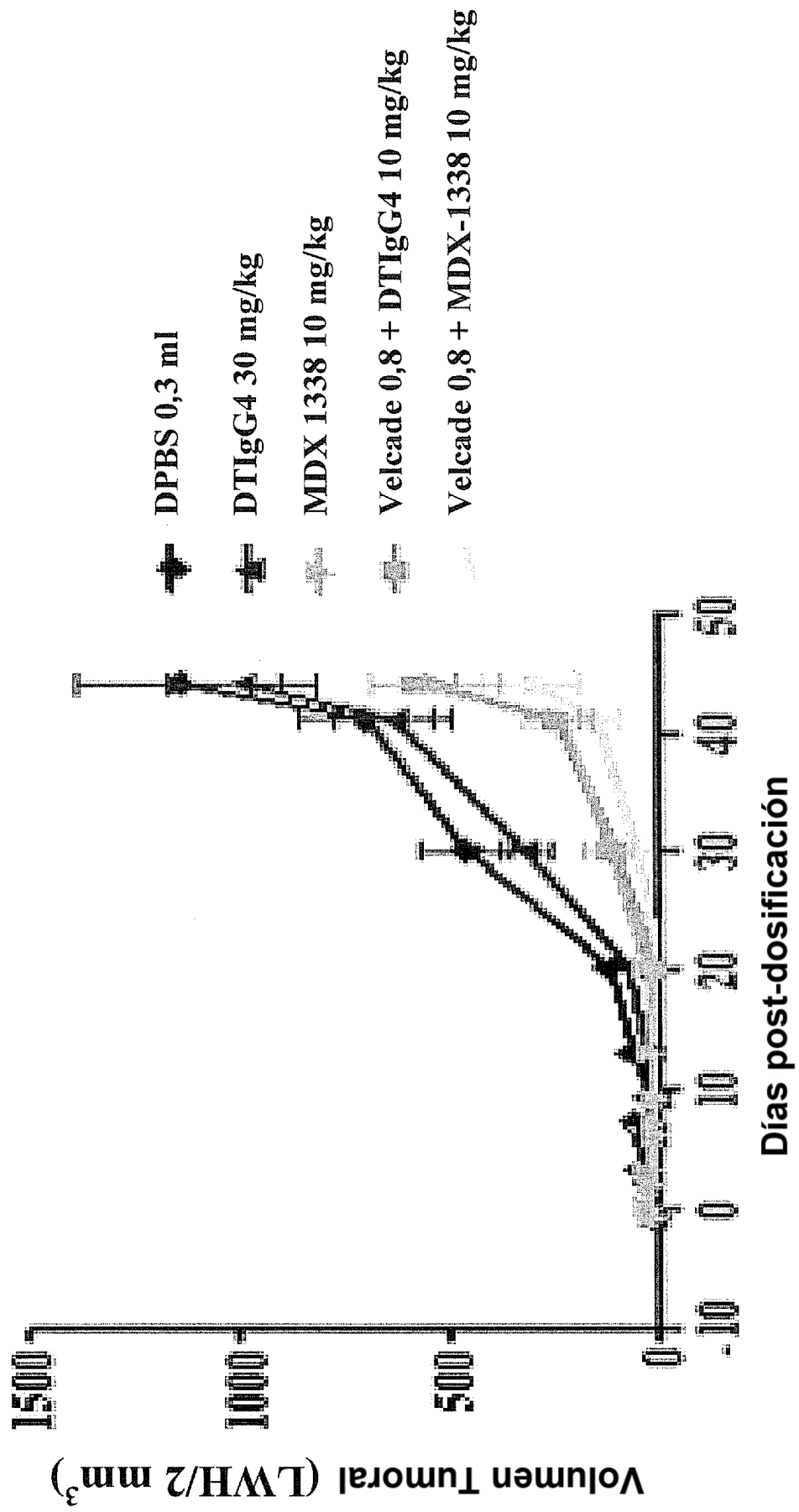


FIG. 18G

MDX-1338-049 MM1S Volúmenes tumorales medios

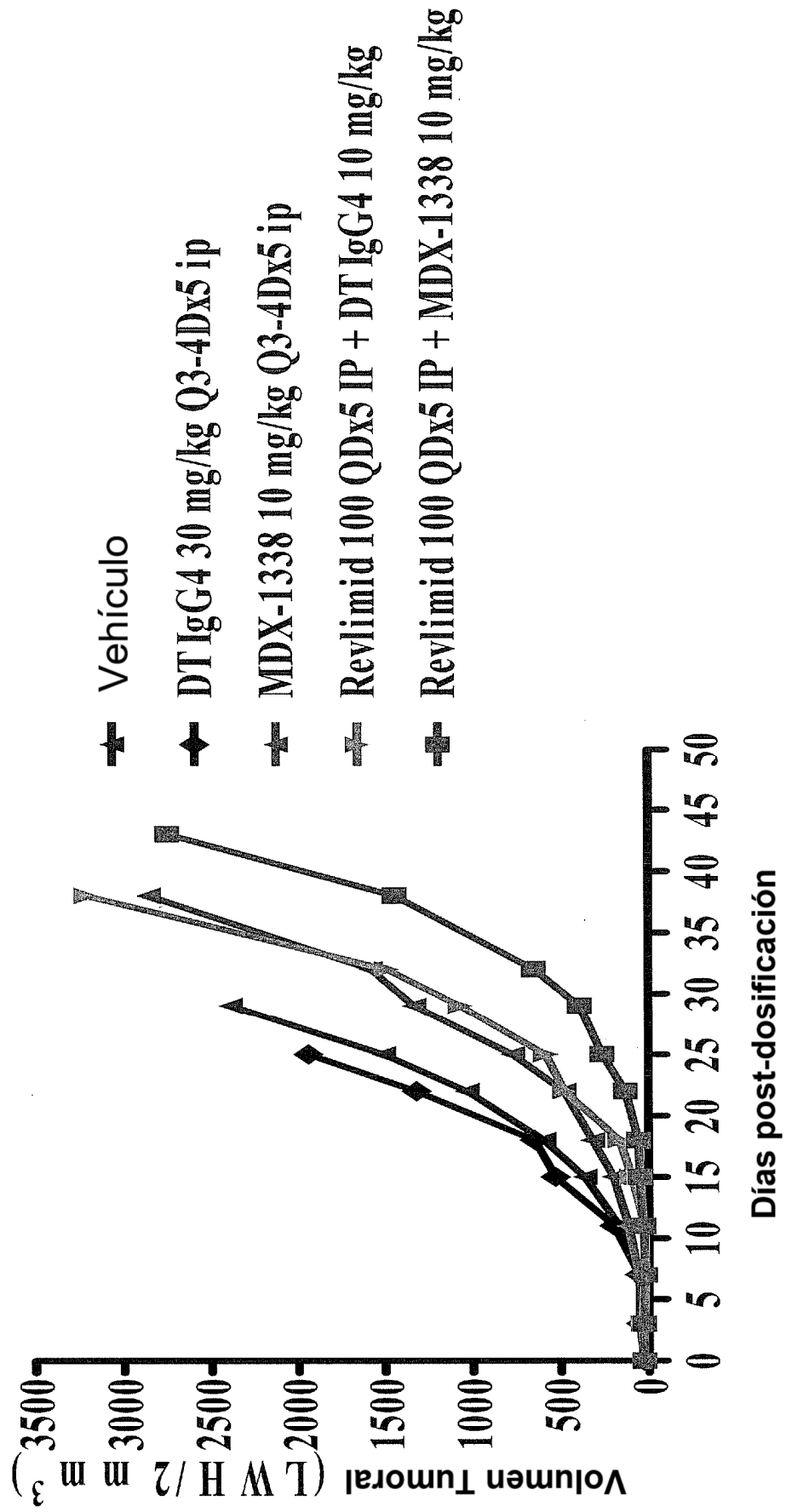


FIG. 18H

## OPM-2 Volúmenes tumorales medios

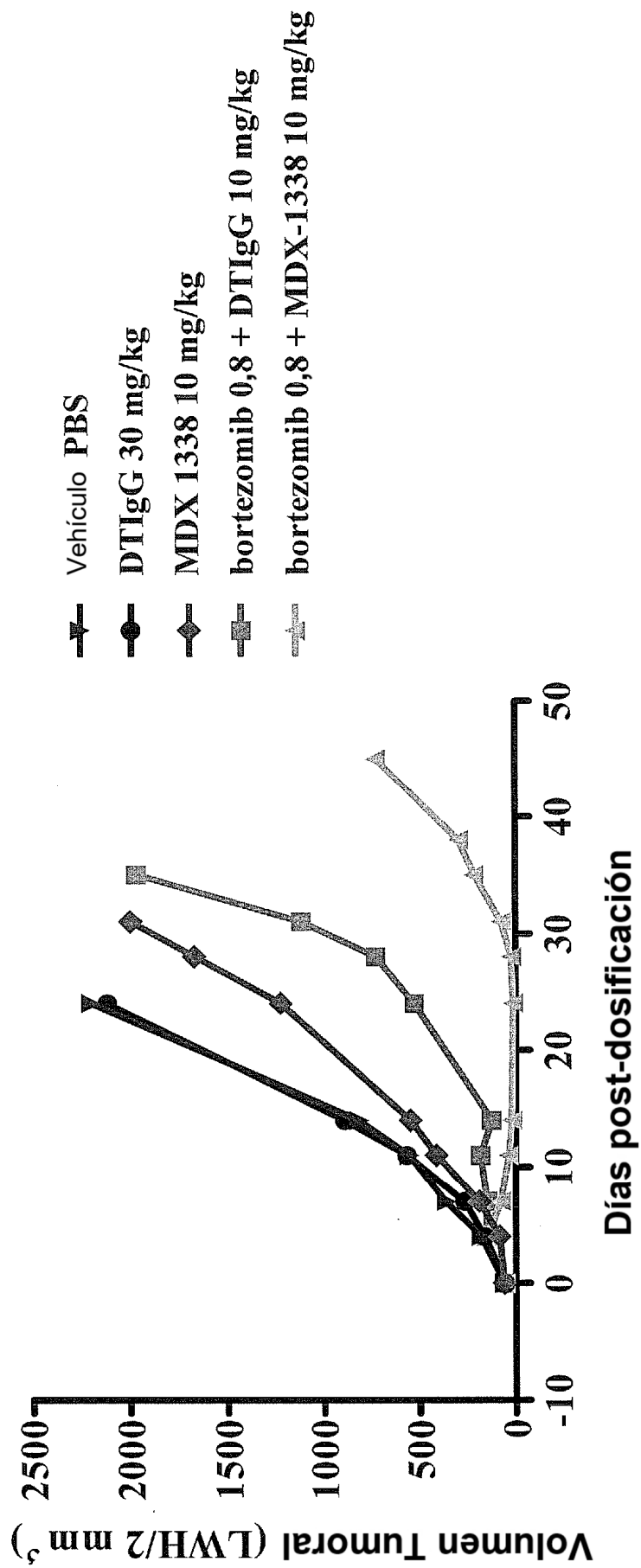


FIG. 18I

## OPM-2 Volúmenes tumorales medios

