

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 369**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11711554 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2552963**

54 Título: **Anticuerpos anti-CXCR4 humanizados para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

30.03.2010 US 749891
30.03.2010 EP 10290167

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2014

73 Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es:

KLINGUER-HAMOUR, CHRISTINE;
JOUHANNEAUD, ALEXANDRA;
GRENIER-CAUSSANEL, VÉRONIQUE y
BERGER, SVEN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 469 369 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CXCR4 humanizados para el tratamiento del cáncer.

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo, en particular, un anticuerpo monoclonal humanizado, capaz de unirse específicamente a los receptores de quimiocinas (CXCR), así como la secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo tal. Desde un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo, compuestos derivados o fragmentos funcionales, que pueden unirse específicamente al CXCR4 y que presentan fuertes actividades antitumorales. La invención también comprende la utilización de dicho anticuerpo como un fármaco para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cáncer, así como en los procedimientos o los kits relacionados con el diagnóstico del cáncer. Finalmente, la invención comprende composiciones que comprenden dicho anticuerpo en combinación o conjugación con otro compuesto (s) contra el cáncer, tales como anticuerpos, toxinas, citotóxico/citostático, y su utilización para la prevención y/o el tratamiento de determinados tipos de cáncer.

15 Las quimiocinas son pequeños péptidos segregados, que controlan la migración de los leucocitos a lo largo de un gradiente químico de ligando, conocido como gradiente de quimiocinas, especialmente durante las reacciones inmunitarias (Zlotnick A. *et al.*, 2000). Se dividen en dos subfamilias principales, CC y CXC, en base a la posición de sus restos de cisteína del terminal NH₂, y se unen a receptores acoplados a la proteína G, cuyos dos principales subfamilias se denominan CCR y CXCR. Más de 50 quimiocinas humanas y 18 receptores de quimiocinas se han descubierto hasta el momento.

25 Muchos cánceres tienen una red de quimiocinas compleja que influye en la infiltración de inmunocitos del tumor, así como en el crecimiento, la supervivencia, la migración y la angiogenia de las células tumorales. Los inmunocitos, las células endoteliales y las propias células tumorales expresan receptores de quimiocinas y pueden responder a gradientes de quimiocinas. Los estudios de muestras de biopsias de cáncer humano y modelos de cáncer de ratón demuestran que la expresión de receptor de quimiocina de las células cancerosas está asociada al aumento de la capacidad metastásica. Las células malignas de diferentes tipos de cáncer tienen diferentes perfiles de expresión de receptor de quimiocinas, pero el receptor 4 de quimiocinas (CXCR4) es el que se encuentra más frecuentemente. Células de por lo menos 23 tipos diferentes de cánceres humanos de origen epitelial, mesenquimático y hematopoyético expresan el receptor CXCR4 (Balkwill F. *et al.*, 2004).

35 El receptor 4 de quimiocinas (también conocido como fusina, CD184, LESTR o HUMSTR) existe como dos isoformas que comprenden 352 o 360 aminoácidos. El resto ASN11 está glucosilado, el resto Tyr21 se modifica por adición de un grupo sulfato y Cys 109 y 186 se unen con un puente disulfuro en la parte extracelular del receptor (Juarez J. *et al.*, 2004).

40 Este receptor es expresado por diferentes tipos de tejidos normales, naturales, linfocitos T sin memoria, linfocitos T reguladores, linfocitos B, neutrófilos, células endoteliales, monocitos primarios, dendrocitos, linfocitos citolíticos naturales, células madre hematopoyéticas CD34+ y a un bajo nivel en el corazón, colon, hígado, riñones y cerebro. CXCR4 desempeña una función clave en el tráfico de leucocitos, linfopoyesis y mielopoyesis de linfocitos B.

45 El receptor CXCR4 se sobreexpresa en un gran número de cánceres como por ejemplo, pero sin limitarse al de colon (Ottaiano A. *et al.*, 2004), de mama (Kato M. *et al.*, 2003), de próstata (Sun Y.X. *et al.*, 2003), pulmonar [carcinoma microcítico y no microcítico (Phillips R.J. *et al.*, 2003)], de ovario (Scotton C.J. *et al.*, 2002), de páncreas (Koshiba T. *et al.*, 2000), de riñones, de cerebro (Barbero S. *et al.*, 2002), glioblastoma y linfomas.

50 El ligando único del receptor CXCR4 descrito hasta el momento es el Factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1) o CXCL2. SDF-1 se segrega en gran cantidad en los ganglios linfáticos, la médula ósea, el hígado, los pulmones y en menor medida por los riñones, el cerebro y la piel. CXCR4 también es reconocido por una quimiocina antagonista, la proteína II inflamatoria de macrófagos víricos (vMIP-II) codificada por el herpesvirus humano tipo III.

55 El eje CXCR4/SDF-1 desempeña una función clave en el cáncer y está directamente implicado en la migración, invasión que lleva a la metástasis. De hecho, las células cancerosas expresan EL receptor CXCR4, migran y entran en la circulación general. A continuación las células cancerosas se detienen en los lechos vasculares en órganos que producen altas concentraciones de SDF-1 donde proliferan, inducen la angiogenia y forman tumores metastásicos (Murphy P.M., 2001). Este eje también está implicado en la proliferación celular mediante la activación de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Barbero S. *et al.*, 2003) y la angiogenia (Romagnani P., 2004). De hecho, receptor CXCR4 y su ligando SDF-1 activan claramente la angiogenia estimulando la expresión de VEGF-A que a su vez aumenta la expresión de CXCR4/SDF-1 (Bachelder R.E. *et al.*, 2002). También se sabe que los macrófagos asociados a tumores (MAT) acumulados en áreas hipóxicas de los tumores y se estimulan para cooperar con las células tumorales y estimular la angiogenia. Se observó que la hipoxia aumentó selectivamente la expresión de CXCR4 en diversos tipos de células, como por ejemplo los MAT (Mantovani A. *et al.*, 2004). Se ha demostrado recientemente que el eje CXCR4/SDF-1 regula el tráfico/seguimiento de células madre/progenitoras hematopoyéticas CXCR4+ (HSC) y podría desempeñar una función en la neovascularización. Las pruebas indican que además de HSC, CXCR4 funcional también se expresa en las células madre a partir procedente de otros tejidos (células madre comprometidas con el tejido = TCSC) de modo que SDF-1 puede desempeñar una función

fundamental como factor quimiotáctico en CXCR4+ TCSC necesaria para la regeneración de órganos/tejidos, pero estas TCSC puede también ser un origen celular del desarrollo del cáncer (teoría de las células madre del cáncer). Un origen de células madre de cáncer se demostró para la leucemia humana y recientemente para varios tumores sólidos tales como los de cerebro y de mama. Hay varios ejemplos de tumores CXCR4+ que pueden proceder de las células madre específicas para tejidos/órganos CXCR4+ normales, tales como leucemias, tumores cerebrales, cáncer pulmonar microcítico, cáncer de mama, hepatoblastoma, cánceres de ovario y de cuello uterino (Kucia M. *et al.*, 2005).

La selección del objetivo de las metástasis de cáncer al interferir con el receptor CXCR4 se demostró *in vivo* utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (Muller A. *et al.*, 2001). En resumen, se demostró que un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (Mab 173 R&D Systems) disminuyó significativamente el número de metástasis en los ganglios linfáticos en un modelo de cáncer de mama ortotópico (MDA-MB231) en ratones SCID. Se ha da a conocer también que ambas funciones de SDF-1 en las células HT-29, la proliferación y la migración de las células HT-29, pudo inhibirse por un anticuerpo monoclonal anti CXCR4 (Ding Y.L. *et al.*, *Chinese Journal of Surgery*, 2009). Otro estudio (Phillips R.J. *et al.*, 2003) también mostró la función crítica del eje SDF-1/CXCR4 en las metástasis en un modelo de carcinoma de pulmón ortotópico (A549) utilizando anticuerpos policlonales contra SDF-1, pero en este estudio no hubo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral ni sobre la angiogenia. Varios otros estudios describen también la inhibición de la metástasis ya sea *in vivo* utilizando siARN bicatenario de CXCR4 (Liang Z. *et al.*, 2005) antagonistas peptídicos de CXCR4 bioestables (Tamamura H. *et al.*, 2003) o crecimiento tumoral *in vivo* utilizando antagonistas de moléculas pequeñas de CXCR4 como AMD 3100 (Rubin J.B. *et al.*, 2003; De Falco V. *et al.*, 2007) o Mab (patente WO2004/059285 A2). Por lo tanto, CXCR4 es un objetivo terapéutico validado para cánceres.

El receptor 2 de quimiocinas (CXCR2), otro receptor de quimiocinas también se describe como un objetivo interesante en oncología. De hecho, CXCR2 transmite una señal de crecimiento celular autocrino en varios tipos de células tumorales y también puede afectar al crecimiento tumoral indirectamente al activar la angiogenia (Tanaka T. *et al.* 2005).

El receptor de quimiocinas CXCR2 abarca 360 aminoácidos. Se expresa principalmente en las células endoteliales y especialmente durante la neovascularización. Varias quimiocinas se unen al receptor CXCR2: CXCL5, -6, -7, IL-8, GRO-a, - β y γ que pertenecen a quimiocinas ERL+ proangiogénicas. Los receptores CXCR2 comparten homología de secuencia con el receptor CXCR4: 37% de identidad de secuencia y 48% de homología de secuencia. El eje CXCR2/ligandos está implicado en varios mecanismos de crecimiento del tumor, tales como metástasis (Singh R.K. *et al.*, 1994), proliferación celular (Owen J.D. *et al.*, 1997) y en angiogenia en la que intervienen como mediadores quimiocinas ERL+ (Strieter R.M. *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2004). Por último, los macrófagos y los neutrófilos asociados a tumores son elementos clave del crecimiento tumoral inflamatorio inducido y las quimiocinas tales como CXCL5, IL-8 y GRO- α inician la recuperación de neutrófilos.

La dimerización ha surgido como un mecanismo común para la regulación de la función de los receptores acoplados a la proteína G, entre estos están los receptores de quimiocinas (Wang J. y Norcross M., 2008). Se ha demostrado que se requiere homo- y hetero-dimerización en respuesta a la fijación de quimiocinas para la iniciación y la alteración de la señalización por numerosos receptores de quimiocinas. La creciente evidencia apoya el concepto de que los dímeros u oligómeros de receptores son probablemente la unidad funcional básica de los receptores de quimiocinas. Los dímeros de receptores de quimiocinas se encuentran en ausencia de ligandos y las quimiocinas provocan cambios de configuración de los dímeros de receptores. CXCR4 es conocido por formar homodímeros pero también heterodímeros, por ejemplo con el receptor opioide δ (DOR) (Hereld D., 2008) o CCR2 (Percherancier Y. y col., 2005). En el último ejemplo, péptidos derivados de los dominios transmembranarios de CXCR4 inhibieron la activación al bloquear las transiciones de configuración inducidas por ligandos del dímero (Percherancier Y. *et al.*, 2005). Otro estudio demostró que el péptido CXCR4-TM4, un péptido sintético de la región transmembrana de CXCR4, disminuye la transferencia de energía entre los protómeros de homodímeros CXCR4 e inhibe la migración inducida por SDF-1 y la polimerización de actina en las células malignas (Wang J. *et al.*, 2006). Más recientemente, se describió también que CXCR7 formaba heterodímeros funcionales con CXCR4 y mejoraba la señalización inducida por SDF-1 (Sierra F. *et al.*, 2007). Otros ejemplos de heterodímeros constitutivos comprenden estudios que demuestran que CXCR1 y CXCR2 interactúan así como que forman homodímeros respectivos. No se observaron interacciones para ninguno de ellos con otro GRCP (alfa (1A)-adrenorreceptor), lo que indica la especificidad de la interacción CXCR1 y CXCR2 (Wilson S. *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores CXCR4 y CXCR2 son dianas tumorales interesantes. La interferencia con esos receptores debería inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis de una manera muy eficaz, al disminuir la proliferación celular del tumor, la angiogenia, la migración de células tumorales y la invasión, la recuperación de neutrófilos y macrófagos por tumores y por la inhibición de las células madre de cáncer CXCR4.

Uno de los aspectos creativos de la presente invención es el de generar un anticuerpo monoclonal humanizado que produce cambios de configuración de dímeros CXCR4. La invención comprende el CXCR4 Mab hz515H7 (o fragmentos del mismo) que puede unirse y producir cambios de configuración tanto de los homodímeros CXCR4 como de los heterodímeros CXCR4/CXCR2, y que presenta fuertes actividades antitumorales. Hz515H7 produce

cambios de configuración en los homodímeros CXCR4 pero también en los heterodímeros CXCR4/CXCR2. Esta nueva propiedad debe ser de interés para la aplicación del tratamiento del cáncer, dadas las importantes funciones de estos dos receptores de quimiocinas en el cáncer.

5 La selección de objetivo tanto de homo- como de hetero-dímeros de receptores ya se ha constatado que aumenta el efecto terapéutico de Mab. De hecho, se ha demostrado por ejemplo, que un Mab (h7C10) dirigido tanto a receptores de IGF-1R como a híbridos de insulín/IGF-1 fue más potente para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* que un Mab dirigido exclusivamente a IGF-1R (Pandini G., 2007).

10 Además, el anti-CXCR4 Mab hz515H7 es un antagonista imperceptible para CXCR4, que no cambia la señal basal en ensayos *in vitro*, pero inhibe la señalización producida por SDF-1 en diferentes ensayos (fijación de GTPγS, liberación de Ca²⁺) y también puede inhibir la migración de células tumorales *in vitro* producida por SDF-1.

15 Las moléculas que actúan como agonistas parciales o agonistas inversos presentan actividad intrínseca en ausencia de ligandos. Estos tipos de moléculas estabilizan, respectivamente un estado de GRCP de alta afinidad o de baja afinidad, incluso en ausencia de ligandos, activando o inhibiendo de este modo corriente abajo cascadas de señalización (Galandin *et al.*, 2007; Kenakin, 2004).

20 En el caso del Mab hz515H7, se comporta como un antagonista imperceptible, sin ninguna actividad intrínseca en el receptor CXCR4 en ausencia de SDF-1. Esta característica farmacológica es probable que esté asociada a menos efectos secundarios adversos en comparación con los agonistas parciales o inversos, como ya se ha observado para los ligandos de receptores de opioides (Bosier y Hermans, 2007). De hecho, la actividad funcional del Mab hz515H7 depende totalmente de la presencia de SDF-1 y no se observará ninguna modulación de la actividad del receptor CXCR4 en los tejidos y órganos en los que la circulación sanguínea no expresa, segrega o proporciona el ligando SDF-1. Por lo tanto, es probable que Mab hz515H7 sea menos tóxico en comparación con otros ligandos del receptor CXCR4 con eficacia positiva o negativa. Además, los antagonistas imperceptibles son las especies minoritarias en el espacio farmacológico (Wurch *et al.*, 1999, Kenakin, 2004).

30 Inesperadamente, por primera vez, se ha conseguido conseguido generar un anticuerpo humanizado capaz de unirse a CXCR4 pero también capaz de producir cambios de configuración de los homodímeros y/o heterodímeros CXCR4. Más específicamente, el anticuerpo humanizado de la invención puede inducir cambios de configuración de los homodímeros CXCR4, pero también de los heterodímeros CXCR4/CXCR2.

35 En la presente memoria, la expresión en plural "dímeros CXCR4" deben entenderse que abarca los homodímeros CXCR4 y también los heterodímeros CXCR4/CXCR2.

Debe mencionarse en esta etapa que dichos anticuerpos humanizados nunca se han descrito en la técnica anterior. Por otra parte, se debe mencionar que la existencia de heterodímeros CXCR4/CXCR2 nunca se ha descrito.

40 Una parte de la presente descripción es el descubrimiento de la existencia de un heterodímero formado por CXCR4 y CXCR2.

Por lo que, en un aspecto concreto, en la presente invención se da a conocer un complejo aislado que comprende o que consiste en el heterodímero CXCR4/CXCR2.

45 Parte del compuesto CXCR4 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2 es una de las dos isoformas CXCR4 humanas seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- 50 - la isoforma b del receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada con el número de registro del Genbank NP_003458 (SEC ID nº 1);
- la isoforma a del receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada con el número de registro de Genbank NP_001008540 SEC ID nº 2);
- 55 - una variante de corte y empalme de la transcripción alternativa o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95% de identidad con una de estas isoformas b o a que tienen la SEC ID nº 1 o 2, y
- un fragmento de la misma que puede ser reconocido específicamente por su factor-1 derivado de células del estroma del ligando natural (SDF-1) y que tiene preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.
- 60

Parte del compuesto CXCR2 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2 se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- 65 - el receptor beta de interleucina 8 [*Homo sapiens*] que tiene la secuencia representada bajo el número de registro de Genbank NP_001548 (SEC ID nº 3);

- una variante de corte y empalme alternativa de la transcripción o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95% de identidad con este receptor beta de interleucina 8 que tiene la SEC ID nº 3; y
- un fragmento de la misma capaz de ser reconocido específicamente por la IL-8 y que tiene preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

En este aspecto particular, se da a conocer también un ARN aislado o ADN que codifica un polipéptido que comprende dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

Se da a conocer además en la presente memoria un montaje nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

La presente descripción comprende además una composición que comprende por lo menos un montaje nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica la parte CXCR4 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, y un segundo montaje, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica la parte CXCR2 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

En este aspecto, en la presente memoria se da a conocer un procedimiento para la preparación de una célula anfitriona recombinante que expresa dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de transformación de dicha célula anfitriona:

- a) con un montaje nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2; o
- b) con por lo menos un montaje nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica la parte CXCR4 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, y un segundo montaje, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica la parte CXCR2 CXCR4/CXCR2 de dicho complejo heterodímero.

Dicha célula anfitriona es una célula eucariota, tal como una célula de mamífero.

El/los montaje(s) nucleico(s) que codifica(n) dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2 codifican también un primer marcador que se asocia (en particular por acoplamiento covalente) a la secuencia de CXCR4, tal como el marcador luc, y un segundo marcador que se asocia (concretamente por acoplamiento covalente) con la secuencia de CXCR2, tal como el marcador GFP (es decir, para el análisis BRET).

Se da a conocer también un procedimiento para seleccionar un compuesto que tiene una actividad contra el cáncer o que se puede utilizar para la preparación de una composición para el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) poner en contacto una célula anfitriona recombinante como se da a conocer en la presente memoria que expresa dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, con el compuesto a ensayar; y
- b) determinar si este compuesto puede modular, preferentemente inhibir, la actividad de este complejo heterodímero CXCR4/CXCR2 en la célula anfitriona recombinante.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la generación y la selección de anticuerpos humanizados según la invención.

En un primer aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4 humanizado, o a uno de sus fragmentos funcionales o derivados, que puede inhibir tanto la activación de CXCR4 dependiente del ligando como la independiente del ligando, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- i) detectar los anticuerpos humanizados generados y seleccionar los anticuerpos capaces de unirse específicamente a CXCR4 y también modular la activación de CXCR4;
- ii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de producir cambio de configuración de homodímeros CXCR4, y a continuación
- iii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de producir cambio de configuración de heterodímeros CXCR4/CXCR2.

Por la expresión "modular", debe entenderse un aumento o una inhibición. Preferentemente, los anticuerpos seleccionados de la invención deben inhibir la activación de CXCR4.

Como se explicó anteriormente, la producción de cambios de configuración de dímeros CXCR4 es un aspecto capital de la invención tal como los anticuerpos presentarán un interés real para una población más grande de pacientes.

5 La generación del anticuerpo se puede realizar por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, a partir de anticuerpos humanizados recombinantes diseñados a partir de las CDR de anticuerpos murinos secuenciados segregados por una fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados u otras especies compatibles con las células de mieloma seleccionadas [Kohler y Milstein, 10 1975, *Nature*, 256:495-497]. Los animales inmunizados podrían incluir ratones transgénicos con los locus de inmunoglobulina humana que luego producen directamente anticuerpos humanos. Otra posible forma de realización podría consistir en la utilización de tecnologías de presentación de fagos para detectar bibliotecas.

15 La etapa i) de detección se puede realizar por cualquier método o procedimiento conocido por los expertos en la materia. Como ejemplos no restrictivos, se pueden mencionar ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis FACS y detecciones funcionales. Un procedimiento preferido consiste en una detección por análisis FACS sobre CXCR4 transfectante y por lo menos en una estirpe celular tumoral para asegurarse de que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también el receptor natural en las células tumorales. Este procedimiento se describirá con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

20 Por la expresión "para modular la activación de CXCR4" se pretende modular por lo menos una de las actividades descritas en los ejemplos 4, 5, 7 y 11 para el anticuerpo murino, 16, 17 y 19 para el híbrido y 27, 24 y 28 para el humanizado a continuación:

25 Preferentemente para modular:

- La fijación específica a membranas celulares del ligando SDF-1 en el receptor CXCR4 (véanse los ejemplos 4, 16, 27), particularmente por la competencia en membranas celulares eucariotas transformadas, tales como membranas CHO-K1, que expresan de forma estable el receptor CXCR4 natural humano;
- La fijación específica a membranas celulares de los GTPγS en el receptor CXCR4 (véanse los ejemplos 5, 17, 24), particularmente en membranas de células transformadas eucariotas, tales como las células NIH-3T3, que expresan de forma estable y constitutiva las membranas del receptor CXCR4 natural;
- La inhibición de la producción de AMPc en la que interviene como mediador CXCR4 (véase el ejemplo 7); y
- La movilización de las reservas de calcio intracelular en la que interviene como mediador el receptor CXCR4 (véanse los ejemplos 11, 19, 28).

Más preferentemente, esta modulación de por lo menos una de estas actividades es una inhibición de la actividad.

45 En una forma de realización preferida de las etapas ii) y iii) de selección del procedimiento, dichas etapas ii) y iii) consisten en la determinación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP, respectivamente, y la selección de anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40%, preferentemente el 45%, 50%, 55% y lo más preferentemente 60% de la señal de BRET.

50 La tecnología BRET es una tecnología conocida como representativa de la dimerización de proteínas [Angers *et al.*, *PNAS*, 2000, 97:3684-89].

La tecnología BRET, utilizada en las etapas ii) y iii) del procedimiento, es bien conocida por el experto en la materia y se detalla en los siguientes ejemplos. Más específicamente, BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia) es una transferencia de energía no radiante que se produce entre un donante bioluminiscente (*Renilla Luciferasa* (Rluc)) y un aceptador fluorescente, un mutante de GFP (proteína verde fluorescente) o YFP (proteína fluorescente amarilla). En el presente caso se utilizó EYFP (proteína amarilla fluorescente mejorada). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donante y el aceptador. Entonces, la transferencia de energía puede ocurrir sólo si las dos moléculas están en estrecha proximidad (1-10 nm). Esta propiedad se utiliza para generar ensayos de interacción proteína-proteína. De hecho, a fin de estudiar la interacción entre dos parejas, la primera se fusiona genéticamente a la *Renilla Luciferasa* y la segunda al mutante amarillo de la GFP. Las proteínas de fusión se expresan generalmente, pero no obligatoriamente, en células de mamífero. En presencia de su sustrato permeable de membranas (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante de GFP está más cerca de 10 nm de la Rluc, puede ocurrir una transferencia de energía y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal de BRET se mide como la relación entre la luz emitida por el aceptador y la luz emitida por el donante. Así que la señal de BRET aumentará a medida que las dos proteínas de fusión se aproximan o si un cambio de configuración aproxima a Rluc y al mutante de GFP.

- Si el análisis de BRET consiste en una forma de realización preferida, cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia puede utilizarse para medir cambios de configuración en dímeros CXCR4. Sin limitación, se pueden mencionar las siguientes tecnologías: FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo), FLIM (Microscopia por duración de la fluorescencia para diagnóstico por Imagen) o SW-FCCS (espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia de una sola longitud de onda).
- Otras tecnologías clásicas también podrían utilizarse, tales como coimmunoprecipitación, Alpha Screen, reticulación química, doble híbrido, cromatografía de afinidad, ELISA o inmunotransferencia Far western.
- En un aspecto concreto del procedimiento, la etapa ii) consiste en la determinación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y que seleccionan anticuerpos capaces de inhibir por lo menos 40%, de la señal de BRET.
- En otro aspecto concreto del procedimiento, la etapa iii) consiste en la determinación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP y que seleccionan anticuerpos capaces de inhibir por lo menos 40%, de la señal de BRET.
- En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo aislado humanizado, o a uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se obtiene por dicho procedimiento. Dicho anticuerpo humanizado o uno de sus dichos fragmentos o derivados, puede unirse específicamente a la CXCR4 humana y, si es necesario, preferentemente, además, capaz de inhibir el acoplamiento natural de su ligando, pudiendo también dicho anticuerpo humanizado producir cambios de configuración en los dímeros CXCR4.
- Las expresiones "fragmentos y derivados funcionales" se definirán con detalle a continuación en la presente memoria.
- Debe apreciarse en la presente memoria que la descripción no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir que no están en su entorno natural sino que se han podido aislar u obtener por purificación a partir de fuentes naturales, o si no obtener por recombinación genética, o por síntesis química, y que entonces pueden contener aminoácidos artificiales, como se describirá a continuación.
- Más concretamente, según otro aspecto, se describe un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizándose dicho anticuerpo humanizado porque comprende por lo menos una región determinante de complementariedad CDR, tal como se define según IMGT, seleccionado de entre las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4 a nº 9.
- Según un segundo aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo humanizado aislado, o a un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de las secuencias SEC ID nº 4, nº 5, nº 6, nº 7, nº 8 o nº 9 o por lo menos una CDR, tal como se define según IMGT, cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 4, 5, 6, 7, 8 o 9.
- Un "fragmento funcional" de un anticuerpo significa, en particular, un fragmento de anticuerpo con la misma especificidad para CXCR4 que el anticuerpo original, tal como los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media se ha aumentado. Dichos fragmentos funcionales se describirán con detalle a continuación en la presente descripción.
- Un "compuesto derivado" o "derivado" de un anticuerpo significa, en particular, una proteína de fijación compuesta por una estructura peptídica y por lo menos una de las CDR del anticuerpo original a fin de conservar su capacidad de reconocer a CXCR4. Dichos compuestos derivados, bien conocidos para un experto en la materia, se describirán con mayor detalle a continuación en la presente descripción. En otra forma de realización, el compuesto o derivado puede comprender por lo menos 2, preferentemente por lo menos 3, más preferentemente 4, aún más preferentemente 5 o, más preferentemente, 6 CDR del anticuerpo original.
- Más preferentemente, en la presente memoria se dan a conocer los anticuerpos humanizados, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, obtenidos por recombinación genética o síntesis química.
- Según una forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque comprende un anticuerpo monoclonal.
- "Anticuerpo monoclonal" significa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpos casi homogénea. Más particularmente, cada uno de los anticuerpos de una población son idénticos excepto por unas pocas mutaciones naturales posibles que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal comprende un anticuerpo homogéneo derivado del crecimiento de un solo clon de células (por ejemplo, un

5 hibridoma, una célula anfitriona eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula anfitriona procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y se caracteriza generalmente por cadenas pesadas de una y sólo una clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que suelen incluir varios anticuerpos dirigidos contra varios determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítomo del antígeno.

10 Más específicamente, el anticuerpo humanizado, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, nº 5 o nº 6, o por lo menos una CDR cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 o nº 6, o que comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, 8 o 9, o por lo menos una CDR cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98 % de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 7, nº8 o nº9.

20 En una manera preferida, los anticuerpos humanizados, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en las que:

- CDR-H1 comprende la secuencia SEC ID nº 4, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 4;
- 25 - CDR-H2 comprende las secuencias SEC ID nº 5, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 5; y
- CDR-H3 comprende las secuencias SEC ID nº 6, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 6.

30 Según una forma de realización específica, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 4, la CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 6.

35 Incluso más preferentemente, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en las que:

- 40 - CDR-L1 comprende la secuencia SEC ID nº 7, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 7;
- CDR-L2 comprende las secuencias SEC ID nº 8, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 8; y
- 45 - CDR-L3 comprende la secuencia ID SEC nº 9, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 9.

50 Según una forma de realización específica, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 7, la CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 8 y la CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 9.

En la presente descripción, los términos "polipéptidos", "secuencias polipeptídicas", "péptidos" y "proteínas unidas a compuestos de anticuerpos o a sus secuencias" son intercambiables.

55 La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables de cualquiera que sea el receptor de antígenos, el tipo de cadena, o las especies [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo, cisteína 23 (1^a-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2^a-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT 105 a 117. En cuanto a los huecos representan posiciones desocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (presentadas entre paréntesis y separados por puntos, p. ej., [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, denominadas IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P.,

Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, P., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. *Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

5 Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se utiliza en la presente memoria para indicar, según el caso, una o varias de estas regiones, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la fijación por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

10 Tal como se utiliza en la presente invención, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar en toda su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiendo llevarse a cabo dicha comparación por segmentos o utilizando un "intervalo de alineación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de la comparación manual, mediante el algoritmo local de homología de Smith y Waterman (1981) [*Ad. App. Math.* 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.* 48:443], mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444] o mediante de programas informáticos utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package de, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por programas informáticos de comparación BLAST NR o BLAST P).

25 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima en las que la secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos a comparar pueden tener adiciones o sustracciones en comparación con la secuencia de referencia para alineamientos óptimos entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el resto de aminoácido o nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en el intervalo de alineación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

35 Por ejemplo, el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova *et al.*, "secuencias Blast 2 - una nueva herramienta para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos", *FEMS Microbiol.*, 1999, Lett. 174:247-250) disponible en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf7bl2.html>, se puede utilizar con los parámetros por defecto (principalmente, para los parámetros "penalización por hueco abierto": 5, y "penalización por ampliación del hueco": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); el programa calcula directamente el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar.

40 Para la secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos comprenden los que contienen la secuencia de referencia, determinadas modificaciones, en particular, una supresión, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". Aquí, la expresión "aminoácidos equivalentes" significa cualesquier aminoácidos susceptibles de ser sustituido por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos específicos definidos a continuación.

50 Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse bien en su homología estructural con los aminoácidos por los que están sustituidos o en los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que puedan generarse.

55 Como un ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las posibles sustituciones susceptibles de llevarse a cabo sin dar lugar a una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente; sustituciones inversas son naturalmente posibles en las mismas condiciones.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn

Resto original	Sustituciones
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Es conocido por los expertos en la materia que en el estado actual de la técnica, la mayor variabilidad (longitud y composición) entre las seis CDR se encuentra en las tres CDR de cadena pesada y, más concretamente, en CDR-H3 de esta pesada cadena. Por consiguiente, será evidente que las CDR características preferidas de los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria, o de uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, serán las tres CDR de la cadena pesada.

La presente invención da a conocer un anticuerpo, o sus fragmentos funcionales, que comprende:

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 4;
 CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 5;
 CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 6;

y una cadena ligera que comprende los tres CDR siguientes:

CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 7;
 CDR-L2 de la secuencia ID SEC nº 8;
 CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 9.

Se describen también en la presente memoria fragmentos funcionales del anticuerpo humanizado descrito anteriormente. Como será obvio para el experto en la materia, un fragmento funcional es necesariamente un fragmento de fijación, es decir, un fragmento capaz de unirse a la misma diana que el anticuerpo original. Un fragmento funcional, por otra parte, conserva la función del anticuerpo original. En particular, un fragmento funcional como se expone en la presente memoria puede modular, la activación de CXCR4. Más preferentemente, un fragmento funcional como se expone en la presente memoria puede inhibir la activación de CXCR4. En una forma de realización, la activación de CXCR4 depende de ligando; en otra forma de realización, dicha activación de CXCR4 es independiente de ligando.

En una forma de realización preferida, los fragmentos funcionales expuestos en la presente memoria conservan la función del anticuerpo original que consiste en modular, la actividad del complejo heterodímero CXCR4/CXCR2. Preferentemente, dichos fragmentos funcionales conservan la capacidad de inhibir la actividad del complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo, o a sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media ha aumentado, tales como los fragmentos PEGilados.

Dichos fragmentos funcionales del anticuerpo según la invención consisten, por ejemplo, en los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida media ha aumentado por modificación química, tal como la adición de polialquilenglicol como por ejemplo polietilenglicol (PEGilación) (fragmentos PEGilados se conocen como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o por incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, dichos fragmentos poseen por lo menos una de las CDR características de los anticuerpos humanizados de la invención que puede ejercer especialmente de manera general actividad, incluso parcial, del anticuerpo de la que surge.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales comprenderán o incluirán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que proceden, siendo suficiente dicha secuencia parcial para conservar la

misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que procede y afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, más preferentemente por lo menos 1/10 de la del anticuerpo de la que procede.

5 Dicho fragmento funcional contendrá por lo menos cinco aminoácidos, preferentemente 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 o 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo de la que procede.

10 Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que generalmente tienen la misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que proceden. Según la presente invención, fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden obtener a partir de los anticuerpos descritos anteriormente por procedimientos tales como digestión con enzimas, como por ejemplo pepsina o papaína, y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden obtener por técnicas de genética recombinante también conocidas para un experto en la materia o por síntesis de péptidos por medio, por ejemplo, de los sintetizadores de péptidos automáticos tales como los comercializados por Applied Biosystems, etc.

15 Más específicamente, la invención se refiere a diferentes variantes de anticuerpos humanizados del Mab 515H7 murino, denominadas en la presente memoria como i) HZ515H7, H_z515H7 o Mab h_z515H7 y ii) HZ515H7-2, H_z515H7-2 o h_z515H7-2 Mab o iii) cualquier combinación de una cadena ligera y/o una cadena pesada de dichas variantes de anticuerpos.

20 Para más claridad, la tabla 2a a continuación resume las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes a las CDR de las variantes humanizadas (también denominadas formas) h_z515H7 y h_z515H7-2 de la invención; la tabla 2b resume las diversas secuencias de aminoácidos que corresponden a los dominios variables y las secuencias completas de las diversas variantes de la forma humanizada h_z515H7 de la invención; y la tabla 2c resume las diversas secuencias de aminoácidos que corresponden a los dominios variables y las secuencias completas de la forma humanizada h_z515H7-2 de la invención.

Tabla 2a

Anticuerpo H _z 515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
CDR(s)	CDR-H1	-	4
	CDR-H2	-	5
	CDR-H3	-	6
	-	CDR-L1	7
	-	CDR-L2	8
	-	CDR-L3	9

30

Tabla 2b

Anticuerpo H _z 515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	VH1	-	10
	VH1 D76N	-	11
	VH1 V48L D76N	-	12
	VH2	-	13
	-	VL1	14
	-	VL1 T59A E61D	15
	-	VL2	16
	-	VL2.1	17
	-	VL2.2	18
	-	VL2.3	19
Secuencias completas (sin péptido señal)	-	VL3	20
	VH1	-	21
	VH1 D76N	-	22
	VH1 V48L D76N	-	23
	VH2	-	24
	-	VL1	25
	-	VL1 T59A E61D	26
	-	VL2	27
	-	VL2.1	28
	-	VL2.2	29
	-	VL2.3	30
-	VL3	31	

Tabla 2c

Anticuerpo Hz515H7-2	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	"consenso"	-	85
	-	"consenso"	86
	VH1	-	87
	-	VL1	88
Secuencias completas (sin péptido señal)	"consenso"	-	89
	-	"consenso"	90
	VH1	-	91
	-	VL1	92

5 Como ejemplo, para evitar dudas, la expresión "VH1" es similar a las expresiones "VH Variante 1", "VH variante 1", "VH Var 1" o "VH var 1). La obtención de secuencias de "consenso" se describe en el ejemplo 22.

10 Sin embargo, otro aspecto específico de la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a sus fragmentos funcionales, caracterizado porque las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada procedentes de anticuerpos humanos son, respectivamente, la región lambda o kappa y la región gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

15 La invención describe el hibridoma murino que segrega un anticuerpo monoclonal archivado en la colección francesa de cultivos de microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, París, Francia) el 25 de junio de 2008, con el número 1-4019. Dicho hibridoma se obtuvo por fusión de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados y células de las 14 estirpes Sp 2/O-Ag de mieloma.

El anticuerpo monoclonal murino, en la presente memoria denominado 515H7 es segregado por el hibridoma archivado en la CNCM el 25 de junio de 2008, con el número 1-4019.

20 La invención también describe anticuerpos híbridos.

Un anticuerpo híbrido es el que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) procedente de un anticuerpo de una especie dada en combinación con regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga con respecto a dicha especie dada.

25 Estos anticuerpos, o fragmentos híbridos de los mismos, se pueden preparar utilizando las técnicas de la genética recombinante. Por ejemplo, el anticuerpo híbrido puede ser producido por clonación de ADN recombinante que contiene un activador y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano de la invención, en particular murino, y una secuencia que codifica la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo híbrido según la invención codificada por dicho gen recombinante podría ser, por ejemplo, un híbrido de ratón-humano, la determinándose la especificidad de este anticuerpo por la región variable procedente del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante procedente del ADN humano. Consultar Verhoeyn *et al.* (*BioEssays*, 8:74, 1988) para los procedimientos para la preparación de anticuerpos híbridos.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada del anticuerpo híbrido (denominada c515H7 VH) que comprende una región variable de la secuencia seleccionada SEC ID nº 83.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo híbrido (denominada c515H7 VL) que comprende una región variable de la secuencia SEC ID nº 84.

40 En una forma de realización preferida concreta, el anticuerpo híbrido, o un fragmento funcional del mismo, de la invención comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 83, y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 84.

45 Un "anticuerpo humanizado", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que comprende por lo menos una cadena pesada o una cadena ligera, conteniendo dicha cadena pesada o ligera regiones CDR procedentes de un anticuerpo de origen no humano, siendo otras partes de la molécula de anticuerpo de origen humano (por ejemplo, dichas otras partes pueden proceder de uno (o varios) anticuerpos humanos). Por la expresión "anticuerpo humanizado", la presente invención comprende por lo tanto anticuerpos con una sola cadena humanizados, siendo la segunda una cadena híbrida o murina. Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" de la invención comprende dos cadenas humanizadas, es decir, tanto la cadena pesada como la cadena ligera son humanizadas.

55 Los anticuerpos humanizados de la invención o fragmentos de los mismos se pueden preparar por técnicas conocidas por un experto en la materia (tales como, por ejemplo, los descritos en los documentos Singer *et al.*, *J. Immun.*, 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10:1-142, 1992; y Bebbington *et al.*,

Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Dichos anticuerpos humanizados se prefieren para su utilización en procedimientos que suponen diagnósticos *in vitro* o tratamiento preventivo y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de humanización, también conocidas para un experto en la materia, tales como, por ejemplo, la técnica de "injerto de CDR" descrita por PDL en las patentes EP 0451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089 y US nº 5.693.761. También pueden citarse las patentes US nº 5.639.641 o nº 6.054.297, nº 5.886.152 y nº 5.877.293.

La invención se refiere a los anticuerpos humanizados procedentes del anticuerpo murino 515H7 descrito anteriormente.

De una manera preferida, las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada procedentes de anticuerpo humano son, respectivamente, la región lambda o kappa y la gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

Más específicamente, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende i) una región marco homóloga a la correspondiente región marco de una cadena pesada de anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las correspondientes CDR de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6.

En otras palabras, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que tiene CDR consistentes en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, comprendiendo dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6. Será evidente, para el experto en la materia, que diferentes estirpes germinativas se pueden seleccionar para la humanización del anticuerpo 515H7, produciendo entonces diferentes formas de 515H7 humanizado. Más específicamente, en una forma de realización preferida no restrictiva, se pueden utilizar diferentes estirpes germinativas para la secuencia que codifica los genes v mientras las mismas estirpes germinativas se conserven para los genes j.

Para la presente invención, las estirpes germinativas que podrían utilizarse se seleccionan sobre la base de dos criterios complementarios:

- la longitud en aminoácidos por cada CDR debe ser idéntica entre la CDR murina y el equivalente en la estirpe germinativa; y
- la secuencia estirpe germinativa en los aminoácidos debe tener por lo menos 70% de identidad con la secuencia murina original.

Para evitar dudas, se recuerda en la presente memoria que la presente invención abarca dos formas humanizadas preferidas no restrictivas (también conocidos como versiones) del mismo anticuerpo 515H7. La primera, denominada Hz515H7, consiste en un anticuerpo humanizado obtenido con los estirpes germinativas IGHV3-49*04 (SEC ID nº 77) e IGHJ4*01 (SEC ID nº 81) para la cadena pesada e IGKV4-1*01 (SEC ID nº 78) e IGKJ1*01 (SEC ID nº 82) para la cadena ligera. La segunda, denominada Hz515H7-2, consiste en un anticuerpo humanizado obtenido con los estirpes germinativas IGHV3-73*01 (SEC ID nº 79) e IGHJ4*01 (SEC ID nº 81) para la cadena pesada e IGKV2D-40*01 (SEC ID nº 80) e IGKJ1*01 (SEC ID nº 82) para la cadena ligera.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12, nº 13, nº 85 o nº 87.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12 o nº 13.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la secuencia SEC ID nº 85.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la secuencia SEC ID nº 87.

En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también a la región variable de la cadena pesada H515H7-2 del anticuerpo humanizado de la secuencia SEC ID nº 87 que comprende uno o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y A81L.

En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 21, nº 22, nº 23, nº 24, nº 89 o nº 91.

En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste de las SEC ID nº 21, nº 22, nº 23 o nº 24.

5 En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEC ID nº 89.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEC ID nº 91.

10 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también a la cadena pesada del anticuerpo humanizado H515H7-2 de secuencia SEC ID nº 91 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y A81L.

15 Más específicamente, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende i) una región marco homóloga a la correspondiente región marco de una cadena ligera de anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las CDR correspondientes de un anticuerpo procedente de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9.

20 En otras palabras, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que tiene CDR que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, dijeron CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias SEC ID nº 7, 8 y 9.

25 En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19, nº 20, nº 86 o nº 88.

30 En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19 o nº 20.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la secuencia SEC ID nº 86.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la secuencia SEC ID nº 88.

40 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo humanizado de la secuencia SEC ID nº 88 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L.

45 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste de las SEC ID nº 25, nº 26, nº 27, nº 28, nº 29, nº 30, nº 31, nº 90 o nº 92.

50 En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7 que comprende la secuencia completa seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 25, nº 26, nº 27, nº 28, nº 29, nº 30 o nº 31.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEC ID nº 90.

55 En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEC ID nº 92.

60 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también a la cadena ligera del anticuerpo humanizado H515H7-2 de secuencia SEC ID nº 92 que comprende uno o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L.

65 Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen cada una regiones i) regiones marco homólogas a las regiones marco correspondientes de un anticuerpo humano, y ii) CDR homólogas a las correspondientes CDR de un anticuerpo procedente de una especie de mamífero diferente, en las que dichas CDR consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprende respectivamente las secuencias

SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera que comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9.

5 En otras palabras, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado comprende cadenas pesadas y ligeras, teniendo dicha cadena pesada CDR que consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y teniendo la cadena ligera CDR que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en las que dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, y dichas CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9.

10 En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12, nº 13, nº 83, nº 85 o nº 87 y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19, nº 20, nº 84, nº 86 o nº 88.

15 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de la cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12 o nº 13 y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19 o nº 20.

20 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 85 y una región variable ligera de secuencia SEC ID nº 86.

25 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87 y una región variable ligera de secuencia SEC ID nº 88.

30 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 85 y una región variable ligera de secuencia SEC ID nº 88.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87 y una región variable ligera de secuencia SEC ID nº 86.

40 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y A81L y la región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 88 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en D40A, L43Q, Y59A, A61D, S69T, G74E y D76Y.

45 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada humanizada, combinada con una cadena ligera híbrida.

50 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada híbrida, combinada con una cadena ligera humanizada.

Más particularmente, la invención describe un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83 y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19, nº 20, nº 86 o nº 88.

55 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL1 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 14.

60 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado C515H7 VH1 / Hz515H7 VL1 T59A E61D o a un fragmento funcional del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 15.

65 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL2 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 16.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL2.1 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 17.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL2.2 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 18.

5 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL2.3 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 19.

10 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7 VL3 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 20.

15 En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 86.

20 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH1 / Hz515H7-2 VL1 o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 83, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 88.

25 En otra forma de realización, la invención describe un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12, nº 13, nº 85 o nº 87 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 / c515H7 VL o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 10, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

30 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N / c515H7 VL o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11, y una región variable de la cadena ligera de secuencia ID SEC nº 84.

35 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N / c515H7 VL o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 12, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

40 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH2 / c515H7 VL o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 13, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

45 En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 85, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / c515H7 VL o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 84.

50 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las SEC ID nº 21, nº 22, nº 23, nº 24, nº 89 o nº 91 y una cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 25, nº 26, nº 27, nº 28, nº 29, nº 30, nº 31, nº 90 o nº 92.

55 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 21, nº 22, nº 23 o nº 24 y una cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 25, nº 26, nº 27, nº 28, nº 29, nº 30 o nº 31.

60 En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 89 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 90.

En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 92.

65 En todavía otra forma de realización, la invención se refiere también al anticuerpo humanizado H515H7-2 que

comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y A81L y la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 92 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en D40A, L43Q, Y59A, A61D, S69T, G74E y D76Y.

5 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 16.

10 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 27.

15 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 17.

20 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 28.

25 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.2, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 18.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.2, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 29.

30 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.3, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 19.

35 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.3, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 30.

40 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 12, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 14.

45 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 23, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 25.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 T59A E61D, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 12, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 15.

50 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 T59A E61D, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 23, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 26.

55 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 VL1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 10, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 14.

60 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 VL1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 21, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 25.

65 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 / Hz515H7-2 VL1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 10, y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 88.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N /

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H_z515H7-2 VH1 / H_z515H7 VL2.1, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 28.

5 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H_z515H7-2 VH1 / H_z515H7 VL2.2, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 29.

10 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H_z515H7-2 VH1 / H_z515H7 VL2.3, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 30.

15 En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H_z515H7-2 VH1 / H_z515H7 VL3, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91, y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 31.

20 Debe entenderse que las combinaciones ejemplificadas VH / VL anteriores no son restrictivas. El experto en la materia podría, por supuesto, sin carga excesiva y sin aplicación de habilidad creativa, reorganizar todas las VH y VL expuestas en la presente memoria. El experto en la materia podría obtener todos los anticuerpos humanizados correspondientes a todas las combinaciones de todas las VH y la VL expuestas en la presente solicitud.

Un aspecto novedoso de la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado caracterizado porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos (incluido cualquier código genético degenerado):

- 25
- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena pesada de anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la presente invención;
 - 30 b) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena ligera de anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la presente invención;
 - c) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la presente invención;
 - 35 d) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico como se define en a), b) o c);
 - e) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones muy rigurosas con por lo menos una cadena pesada que comprende las secuencias SEC ID nº 38 a 41, 49 a 52, 93 o 95 de ácidos nucleicos preferentemente con por lo menos una de las 3 CDR de las mismas según la numeración de CDR IMGT o Kabat;
 - 40 f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones muy rigurosas con por lo menos una cadena ligera que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID nº 42 a 48, 53 a 59, 94 o 96 preferentemente con por lo menos una de las 3 CDR de los mismos según la numeración de CDR IMGT o Kabat.
 - 45

La presente exposición también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado, comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada una secuencia nucleotídica CDR-H1 de SEC ID nº 32; un secuencia nucleotídica CDR-H2 de la SEC ID nº 33; y una secuencia nucleotídica CDR-H3 de SEC ID nº 34.

La presente exposición también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado, comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera una secuencia nucleotídica CDR-L1 de SEC ID nº 35 o 60; un secuencia CDR-L2 nucleotídica de SEC ID nº 36 o 61, y una secuencia nucleotídica CDR-L3 de SEC ID nº 37 o 62.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado, comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada una secuencia nucleotídica CDR-H1 de SEC ID nº 32; una secuencia nucleotídica CDR-H2 de SEC ID nº 33, y una secuencia nucleotídica CDR-H3 de SEC ID nº 34;

65 dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia nucleotídica CDR-L1 de SEC ID nº 35 o 60; una secuencia nucleotídica CDR-L2 de SEC ID nº 36 o 61; y una secuencia

nucleotídica CDR-L3 de SEC ID nº 37 o 62.

La tabla 3a a continuación resume una de las secuencias nucleotídicas optimizadas que corresponden a las CDR del anticuerpo hz515H7 de la invención; la tabla 3b resume las diversas secuencias nucleotídicas optimizadas que corresponden a los dominios variables y las secuencias completas de las diversas variantes del anticuerpo humanizado hz515H7 de la invención. La tabla 3c resume las diversas secuencias nucleotídicas optimizadas que corresponden a los dominios variables y las secuencias completas la versión humanizada hz515H7-2 de la invención.

Tabla 3a

Anticuerpo HZ515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
CDR(s) optimizadas	CDR-H1	-	32
	CDR-H2	-	33
	CDR-H3	-	34
	-	CDR-L1	35
	-	CDR-L1 (bis)	60
	-	CDR-L2	36
	-	CDR-L2 (bis)	61
	-	CDR-L3	37
	CDR-L3 (bis)	62	

Tabla 3b

Anticuerpo HZ515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	VH1	-	38
	VH1 D76N	-	39
	VH1 V48L D76N	-	40
	VH2	-	41
	-	VL1	42
	-	VL1 T59A E61D	43
	-	VL2	44
	-	VL2.1	45
	-	VL2.2	46
	-	VL2.3	47
Secuencias completas (sin péptido señal)	-	VL3	48
	VH1	-	49
	VH1 D76N	-	50
	VH1 V48L D76N	-	51
	VH2	-	52
	-	VL1	53
	-	VL1 T59A E61D	54
	-	VL2	55
	-	VL2.1	56
	-	VL2.2	57
-	VL2.3	58	
-	VL3	59	

Tabla 3c

Anticuerpo HZ515H7-2	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
Dominios variables	VH1	-	93
	-	VL1	94
Secuencias completas (sin péptido señal)	VH1	-	95
	-	VL1	96

La expresión "secuencia optimizada" significa que los codones que codifican los aminoácidos constitutivos de la proteína de interés (en la presente memoria los dominios variables de anticuerpos) se han optimizado para un mejor reconocimiento por el mecanismo de traducción en un tipo de célula específico, las células de mamífero incluidas aquí. A este respecto, la secuencia de aminoácidos de la proteína dada codificada por la secuencia optimizada es idéntica a la de la secuencia no optimizada, pero la secuencia nucleotídica es diferente. La optimización también comprenden adaptación al contenido de G/C y prevención de la estructura secundaria del ARN estable (véase como ejemplo Kim *et al.*, 1997 *Gene* 199 (L-2):293-301).

5 Por ejemplo, la secuencia nucleotídica de la CDR-H1 murina (SEC ID nº 71) se ha optimizado y corresponde a la secuencia nucleotídica de la CDR-H1 humanizada (SEC ID nº 32) en la que los codones ggg, act y gat (que codifican los restos Gly, Thr y Asp, respectivamente) se han sustituido por los codones ggc, acc y gac, respectivamente (que codifican también los restos Gly, Thr y Asp, respectivamente).

En cuanto a CDR-H2 y CDR-H3 (SEC ID nº 72 y 73, respectivamente), también se han optimizado y corresponden a las CDR optimizadas de las SEC ID nº 33 y 34, respectivamente.

10 Es lo mismo para las tres CDR de la cadena ligera (SEC ID nº 74, 75 y 76, respectivamente) con dos formas optimizadas humanizados correspondientes a la VL1, VL2 y VL3 (SEC ID nº 35, 36 y 37, respectivamente) y para la VL2.1, VL2.2 y VL2.3 (SEC ID nº 60, 61 y 62, respectivamente).

15 La tabla 4 siguiente resume las CDR originales, es decir, las secuencias murinas no optimizadas.

Tabla 4

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
CDR(s) murina(s)	CDR-H1	-	71
	CDR-H2	-	72
	CDR-H3	-	73
	-	CDR-L1	74
	-	CDR-L2	75
	-	CDR-L3	76

20 Las expresiones "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia polinucleotídica" y "secuencia nucleotídica", utilizada indistintamente en la presente descripción, significa una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene nucleótidos artificiales o no, y que es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o los productos de transcripción de dichos ADN.

25 También debe incluirse en la presente memoria que la presente invención no se refiere a secuencias nucleotídicas en su medio cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han aislado y/o purificado, es decir, se tomaron muestras directa o indirectamente, por ejemplo, mediante una copia, habiéndose modificado su medio por lo menos parcialmente. Los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por medio, por ejemplo, de células anfitrionas, u obtenidos por síntesis química también deben mencionarse en la presente memoria.

30 "Secuencias nucleicas que presentan un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, después de la alineación óptima con una secuencia preferida" significa secuencias nucleicas que presentan, con respecto a la secuencia nucleico de referencia, determinadas modificaciones tales como, en particular, una supresión, un truncamiento, una extensión, una fusión híbrida y/o una sustitución, en particular puntual. Preferentemente, estos son secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos que la secuencia de referencia, estando ésta relacionada con la degeneración del código genético, o secuencias de complementariedad que son probablemente para hibridarse específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente en condiciones muy rigurosas, en particular las que se definen a continuación.

35 Hibridación en condiciones muy rigurosas significa que se seleccionan condiciones relacionadas con la temperatura y la fuerza iónica de tal manera que permiten que la hibridación se mantenga entre dos fragmentos de ADN complementarios. Sobre una base puramente ilustrativa, las condiciones muy rigurosas de la etapa de hibridación a fin de definir los fragmentos de polinucleótidos descritos anteriormente son ventajosamente las siguientes.

40 La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante tres horas en tampón de fosfato (20 mM, pH 7,5) que contienen 5X SSC (1X SSC corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato de sodio 0,015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10X solución de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación primaria durante 20 horas a una temperatura en función de la longitud de la sonda (es decir: 42°C para una sonda > 100 nucleótidos de longitud) seguido de dos lavados de 20 minutos a 20°C en 2X SSC + 2% de SDS, un lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 X SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 X SSC + 0,1% SDS durante 30 minutos a 60°C para una sonda > 100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación muy rigurosas descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido se pueden adaptar por un experto en la materia para oligonucleótidos más largos o más cortos, según los procedimientos descritos en Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edición, 2001).

La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la invención.

La invención se refiere en particular a vectores de clonación y/o expresión que contienen dicha secuencia nucleotídica.

5 Los vectores de la invención contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias nucleotídicas en una célula anfitriona dada. El vector debe contener por lo tanto un activador, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como regiones de regulación de la transcripción adecuadas. Deben poder mantenerse de manera estable en la célula anfitriona y, opcionalmente, pueden tener señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos son seleccionados y optimizados por un experto en la materia según la célula anfitriona utilizada. Con este objetivo, las secuencias nucleotídicas pueden insertarse en vectores autorreproductores en el anfitrión elegido o ser vectores integrantes del anfitrión elegido.

15 Dichos vectores se preparan por procedimientos normalmente utilizados por un experto en la materia y los clones resultantes pueden introducirse en un anfitrión adecuado por procedimientos habituales, tales como la lipofección, electroporación, choque térmico o procedimientos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de plásmido o de origen vírico. Se utilizan para transformar células anfitrionas con el fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas de la invención.

20 La invención también comprende células anfitrionas transformadas por un vector o que comprende el mismo como se describe en la presente invención.

La célula anfitriona puede seleccionarse entre sistemas procariotas o eucariotas, tales como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de levadura o células animales, células en particular de mamíferos. También se pueden utilizar células de insectos o de plantas.

La invención también se refiere a los animales, aparte del hombre, que tienen células transformadas según la invención.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo según la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 35 a) el cultivo en un medio de células anfitrionas y las condiciones de cultivo adecuadas para las mismas según la invención, y
- b) la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de este modo en el medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.

40 Las células transformadas según la invención se utilizan en procedimientos para la preparación de polipéptidos recombinantes según la invención. Los procedimientos para la preparación de polipéptidos según la invención en forma recombinante, caracterizados porque dichos procedimientos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector según la invención, también están comprendidos en la presente invención. Preferentemente, una célula transformada por un vector según la invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido mencionado anteriormente y la recuperación de dicho péptido recombinante.

50 Como ya se ha mencionado, la célula anfitriona se puede seleccionar entre los sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias nucleotídicas de la invención que facilitan la secreción en dicho sistema procariota o eucariota. Un vector según la invención que lleva dicha secuencia puede utilizarse por lo tanto ventajosamente para que se segregue la producción de proteínas recombinantes. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se verá facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en vez de en el interior de células anfitrionas.

55 Los polipéptidos de la invención también se pueden preparar por síntesis química. Uno de dichos procedimientos de preparación es también objeto de la presente exposición. Un experto en la materia conoce procedimientos para la síntesis química, tales como técnicas de fase sólida (véase en particular Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^a ed.) o técnicas en fase sólida parcial, por condensación de fragmentos o por síntesis convencional en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y que pueden contener los correspondientes aminoácidos artificiales también están comprendidos en la presente exposición.

60 Los anticuerpos, o los fragmentos funcionales de los mismos, susceptibles de ser obtenidos por el procedimiento de la invención también están comprendidos en la presente invención.

65 Según todavía otro aspecto, la presente exposición se refiere a un anticuerpo como se describió anteriormente, caracterizado porque además es capaz de unirse específicamente a un receptor de la familia de quimiocinas humanas y/o capaz de inhibir específicamente la señalización de dicho receptor.

Por lo tanto, la presente exposición comprende además un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que constan de un anticuerpo que es biespecífico en el sentido de que comprende un segundo motivo capaz de interactuar con cualquier receptor implicado en el desarrollo de tumores, tales como, por ejemplo, VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, Her2neu, HGF, cMET, FGF, tetraspaninas, integrinas, CXCR4 (otro aparte del anticuerpo de la presente invención, es decir, dirigido a otro epítipo), CXCR7 o CXCR2.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales constituyen una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Hollinger y Bohlen, 1999, *Cancer and metastasis*, rev. 18:411-419). Su utilidad se demostró tanto en dominios de diagnóstico como terapéuticos con relación a su capacidad para recuperar nuevas funciones efectoras o para dirigir varias moléculas a la superficie de las células tumorales; dichos anticuerpos se pueden obtener por procedimientos químicos (Glennie M.J. *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995, *J. Hemat.*, 377-382) o procedimientos somáticos (Staerz U.D. y Bevan M.J., 1986, *PNAS* 83, 1453-1457; Suresh M.R. *et al.*, 1986, *Method Enzymol.*, 121:210-228), pero también, preferentemente, por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y por lo tanto facilitar la purificación del anticuerpo buscado (Merchand *et al.*, 1998, *Nature Biotech.*, 16:677-681).

Estos anticuerpos biespecíficos pueden considerarse IgG entera, Fab'2 biespecífico, Fab'PEG, diacuerpos o scFv biespecífico, pero también un anticuerpo biespecífico tetravalente en la que dos lugares de fijación están presentes por cada antígeno específico (Park *et al.*, 2000, *Mol. Immunol.*, 37 (18): 1123-1130) o los fragmentos de los mismos como se describió anteriormente.

Además de una ventaja económica dado que la producción y administración de un anticuerpo biespecífico son más económicas que la producción de dos anticuerpos específicos, la utilización de dichos anticuerpos biespecíficos tiene la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. De hecho, la utilización de un anticuerpo biespecífico permite disminuir la cantidad global de anticuerpos circulantes y, por consiguiente, la posible toxicidad.

Preferentemente, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo bivalente o tetravalente.

Por último, la presente invención se refiere al anticuerpo descrito anteriormente, o a sus fragmentos funcionales, para su utilización como fármaco.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos funcionales. Preferentemente, dicho anticuerpo se complementa con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a una composición caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para su utilización de manera simultánea, aparte o prolongada, otro anticuerpo antitumoral aparte de un anticuerpo dirigido contra CXCR4.

Según todavía otra forma de realización, la composición farmacéutica como se describe anteriormente comprende por lo menos un segundo compuesto antitumoral seleccionado de entre los compuestos capaces de inhibir específicamente la actividad por tirosina cinasa de receptores tales como el IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR o VEGF, o cualquier otro compuesto antitumoral conocido por un experto en la materia.

En un segundo aspecto preferido, dicho segundo compuesto se puede seleccionar de entre los anticuerpos antiEGFR, antiIGF-IR, antiHER2/neu, antiMET, VEGFR, VEGF, etc., aislados, o sus fragmentos funcionales y compuestos derivados, capaces de inhibir la actividad proliferativa y/o antiapoptótica y/o angiogénica y/o inductiva de la diseminación metastásica estimulada por dichos receptores.

También son dignos de mención los anticuerpos antiCD20 tales como rituximab, ibritumomab o tositumomab; anticuerpos antiCD33 tales como gemtuzumab o lintuzumab; anticuerpos antiCD22 tal como epratuzumab; anticuerpos antiCD52 tal como alemtuzumab; anticuerpos antiEpCAM tales como edrecolomab, Ch 17-1A o IGN-101; antiCTP21 o 16 anticuerpos tal como Xactina; anticuerpos antiADN-Ag tal como I-Cotara TNT-1; anticuerpos antiMUC1 tal como pentumomab o R1150; anticuerpos antiMUC18 tal como ABX-MA1; anticuerpos antiGD3 tal como mitumomab; anticuerpos antiECA tal como CeaVac o labeltuzumab; anticuerpos antiCA125 tal como OvaRex; anticuerpos antiHLA-DR tal como apolizumab; anticuerpos antiCTLA4 tal como MDX-010; anticuerpos antiPSMA tal como MDX-070, ¹¹¹In e ⁹⁰Y-J591, ¹⁷⁷Lu J591, J591-DM1; anticuerpos antiLewis Y tal como IGN311; anticuerpos antiangiogénicos tales como AS1405 y 90YmuBC1; anticuerpos antiTrail-R1 tal como TRAIL R1Mab o TRAIL R2Mab.

Otra forma de realización complementaria a la invención consiste en una composición como se describió anteriormente compuesta de, además, como una combinación o producto de conjugación para la utilización simultánea, aparte o prolongada, de un agente citotóxico/citostático.

"Utilización simultánea" significa la administración de ambos compuestos de la composición comprendidos en una forma farmacéutica única.

"Utilización aparte" significa la administración, al mismo tiempo, de ambos compuestos de la composición, comprendidos en formas farmacéuticas distintas.

- 5 "Utilización prolongada" significa la administración sucesiva de ambos compuestos de la composición, incluido cada uno en una forma farmacéutica distinta.

Generalmente, la composición según la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención mejora de una manera inesperada por la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja importante posterior producida por una composición de la invención se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces más bajas del principio activo, por lo que es posible evitar o reducir los riesgos de la aparición de efectos secundarios, en particular, el efecto del agente citotóxico. Por otra parte, esta composición permite conseguir el efecto terapéutico esperado más rápidamente.

- 10
15 "Agente terapéutico contra el cáncer" o "agente citotóxico" significa una sustancia que, cuando se administra a un paciente, para tratar o evitar el desarrollo de cáncer en el paciente. Ejemplos no restrictivos de dichos agentes comprenden agentes "alquilantes", antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la mitosis, inhibidores de funcionamiento de la cromatina, antiangiogénos, antiestrógenos, antiandrógenos e inmunomoduladores.

- 20 Dichos agentes, por ejemplo, se citan en VIDAL, en la página dedicada a los compuestos relacionados con la oncología y hematología bajo el epígrafe "citotóxicos", los compuestos citotóxicos citadas por referencia al presente documento se citan en la presente memoria como agentes citotóxicos preferidos.

- 25 "Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia que se puede unirse por enlace covalente a cualquier molécula o puede alquilarla, preferentemente un ácido nucleico (p. ej., ADN), dentro de una célula. Ejemplos de dichos agentes alquilantes comprenden las mostazas de nitrógeno tales como mecloretamina, clorambucilo, hidrocloreuro de melfalán, pipobromán, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazafosforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfosfosfamida o ifosfamida; aziridinas o etileniminas tales como tiotepa, trietilenamina o altretamina; nitrosoureas tales como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, treosulfán o improsulfán; triazenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino o carboplatino.

- 35 "Antimetabolito" se refiere a una sustancia que bloquea el crecimiento y/o el metabolismo celular al interferir con determinadas actividades, en general, la síntesis de ADN. Ejemplos de antimetabolitos comprenden metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, arabinósido de citosina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, desoxicofurmidina y pentostatina.

- 40 "Antibiótico antitumoral" se refiere a un compuesto que puede evitar o inhibir la síntesis de ADN, ARN y/o proteínas. Ejemplos de dichos antibióticos antitumorales comprenden doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

- 45 Los "inhibidores de la mitosis" evitan la evolución normal del ciclo celular y la mitosis. En general, los inhibidores de microtúbulos o "taxoides" tales como paclitaxel y docetaxel son capaces de inhibir la mitosis. Los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, también son capaces de inhibir la mitosis.

- 50 Los "inhibidores de la cromatina" o los "inhibidores de la topoisomerasa" son sustancias que inhiben el funcionamiento normal de las proteínas que forman la cromatina, tales como las topoisomerasas I y II. Ejemplos de dichos inhibidores comprenden, para la topoisomerasa I, camptotecina y sus derivados, tales como irinotecán o topotecán; para la topoisomerasa II, etopósido, fosfato de etipósido y tenipósido.

- 55 Un "antiangiogénico" es cualquier fármaco, compuesto, sustancia o agente que inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de los antiangiogénicos comprenden, sin ser restrictivos, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023 A, halofuginona, COL-3, neovastat BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y vitaxina.

- 60 "Antiestrógeno" o "antagonista de estrógenos" se refiere a cualquier sustancia que disminuye, antagoniza o inhibe la acción de los estrógenos. Ejemplos de dichos agentes son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

- 65 "Antiandrógeno" o "antagonista de andrógenos" se refiere a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de andrógenos. Ejemplos de antiandrógenos comprenden flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, acetato de ciproterona, finasterida y cimitidina.

Los inmunomoduladores son sustancias que estimulan el sistema inmunitario. Los ejemplos de inmunomoduladores

comprenden interferón, interleucinas tales como aldesleucina, OCT-43, denileucina diftotox o interleucina-2, factores de necrosis tumoral, tales como tasonermina, u otros tipos de inmunomoduladores tales como el lentinán, sizofirán, roquinimex, pidotimod, pegademasa, timopentina, poli I:C o levamisol en combinación con 5-fluorouracilo.

5 Para más detalles, un experto en la materia puede hacer referencia al manual publicado por la Asociación Francesa de profesores de Química Terapéutica titulado "Therapeutic chemistry, vol. 6, Antitumor drugs and perspectives in the treatments of cancer, TEC y DOC edición, 2003 [en francés]"

10 En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición de la invención como producto de combinación se caracteriza porque dicho agente citotóxico está unido químicamente a dicho anticuerpo para su utilización de forma simultánea.

15 En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición se caracteriza porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona entre los inhibidores o estabilizantes del huso, preferentemente vinorelbina y/o vinflunina y/o vincristina.

20 A fin de facilitar la fijación entre dicho agente citotóxico y el anticuerpo según la invención, se pueden introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos para unir, tales como el poli(alquilen)glicol polietilenglicol o los aminoácidos; o, en otra forma de realización, se pueden utilizar dichos principios activos de agentes citotóxicos, en la que se han introducido funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de fijación son bien conocidas por un experto en la materia y no se expondrán con más detalle en la presente descripción.

25 Otros inhibidores de EGFR comprenden, sin ser restrictivos, los anticuerpos monoclonales C225 y antiEGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) o compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), flunomida (Farmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol-board Myers Squibb), RC-3940-II (Farmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer), WHI-P97 (Parker Hughes Center Cancer), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) o la "vacuna contra EGFR" (York Medical/Centro de Inmunología Molecular).

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición caracterizada porque por lo menos uno de dichos anticuerpos, o fragmentos funcionales de la misma, se combina o se conjuga con una toxina celular y/o un radioisótopo.

40 Preferentemente, dicha toxina o dicho radioisótopo puede evitar el crecimiento o la proliferación de la célula tumoral, en particular de inactivar completamente dicha célula tumoral.

También preferentemente, dicha toxina es una toxina de enterobacterias, especialmente exotoxina A de *Pseudomonas*.

45 Los radioisótopos preferentemente combinados con anticuerpos terapéuticos son los radioisótopos que emiten rayos gamma, preferentemente yodo¹³¹, itrio⁹⁰, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos que emiten rayos alfa y beta también pueden utilizarse en el tratamiento.

50 "Toxina o radioisótopo, combinado con por lo menos un anticuerpo de la invención, o un fragmento funcional del mismo" se refiere a cualquier medio que permite unir dicha toxina o dicho radioisótopo al que por lo menos un anticuerpo, en particular por enlace covalente entre los dos compuestos, con o sin la introducción de la molécula de fijación.

55 Ejemplos de agentes que permiten el enlace químico (covalente), electrostático, o no covalente de la totalidad o parte de los elementos del conjugado comprenden, en particular, benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), tioacetato de N-succinimidil S-acetilo (SATA), agentes de puenteo con uno o más grupos, con uno o más grupos fenilo aparte, reaccionar con rayos ultravioleta (UV), aún más preferentemente N-[4(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), propionato de N-succinimidil 3(2-piridilditio) (SPDP) y 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

60 Otra forma de enlace, en particular para los radioisótopos, puede consistir en la utilización de agentes quelantes iónicos bifuncionales.

65 Ejemplos de dichos quelantes comprenden los quelantes derivados de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) o DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), que se desarrollaron para unir metales, particularmente metales radiactivos, con inmunoglobulinas. Por lo tanto, DTPA y sus derivados pueden estar sustituidos en la cadena de

carbono por varios grupos de tal manera que aumentan la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek *et al.*, 1977; Brechbiel *et al.*, 1991; Gansow, 1991; patente US 4.831.175).

5 Por ejemplo, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y sus derivados, que durante mucho tiempo se han utilizado ampliamente en fármacos y biología, ya sea en su forma libre o en un complejo con un ion metálico, presentan la característica notable de la formación de quelatos estables con iones metálicos que pueden acoplarse con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico, tales como anticuerpos, para el desarrollo de radioinmunoconjugados para el tratamiento del cáncer (Meases *et al.*, 1984; Gansow *et al.*, 1990).

10 También preferentemente, por lo menos dicho anticuerpo de la invención que forma dicho conjugado se selecciona entre sus fragmentos funcionales, en particular los fragmentos que han perdido su componente Fc, tales como los fragmentos scFv.

15 La presente invención también comprende la utilización de la composición para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento del cáncer.

20 La presente invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, preferentemente humanizado, y/o de una composición según la invención para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento de células tumorales. Generalmente, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, preferentemente humanizado, y/o de una composición, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento del cáncer.

25 Los cánceres preferidos que pueden prevenirse y/o tratarse comprenden cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o de cualquier otro tipo de cáncer.

30 La invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo, o a un fragmento funcional del mismo, y/o de una composición como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para modular la actividad de CXCR4 en una célula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización del anticuerpo como se describe en un procedimiento de diagnóstico, preferentemente *in vitro*, de las enfermedades relacionadas con el nivel de expresión de CXCR4. Preferentemente, dichas enfermedades relacionadas con la proteína CXCR4 en dicho procedimiento de diagnóstico serán los cánceres.

35 Por lo tanto, los anticuerpos de la invención, o los fragmentos funcionales de los mismos, se pueden emplear en un procedimiento para la detección y/o cuantificación de la proteína CXCR4 en una muestra biológica *in vitro*, en particular para el diagnóstico de enfermedades asociadas a una expresión anormal con esta proteína, tales como cánceres, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 40
- a) colocar la muestra biológica en contacto con un anticuerpo según la invención, o un fragmento funcional del mismo;
 - 45 b) demostrar el complejo antígeno-anticuerpo posiblemente formado.

Por lo tanto, la presente invención también comprende los kits o accesorios para la realización de un procedimiento como el descrito, que comprende los elementos siguientes:

- 50
- a) un anticuerpo policlonal o monoclonal de la invención;
 - 55 b) opcionalmente, los reactivos para constituir el medio favorable a reacciones inmunológicas;
 - c) opcionalmente, reactivos que ponen de manifiesto los complejos de antígeno-anticuerpos producidos por la reacción inmunológica.

De una manera general, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6; y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 7, 8, 9, para el diagnóstico *in vitro* de un trastorno oncogénico asociado a la expresión de CXCR4 o la determinación *in vitro* del pronóstico para el desarrollo de un trastorno oncogénico asociado a la expresión de CXCR4.

60 En cuanto a este aspecto, la presente invención se refiere particularmente a la utilización de un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la invención para el diagnóstico *in vitro* un trastorno oncogénico asociado a la expresión de CXCR4 o la determinación *in vitro* del pronóstico para el desarrollo de un trastorno oncogénico asociado a la expresión de CXCR4.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* de la presencia y/o la localización de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (a) poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 7, 8, 9, y (b) detectar la fijación de dicho anticuerpo a la muestra.

Particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección *in vitro* de la presencia y/o la localización de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a) poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la invención; y

(b) detectar la fijación de dicho anticuerpo a la muestra.

Como ejemplo no restrictivo, dicha detección se puede hacer por FACS, o cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia.

Se expone también un procedimiento para determinar *in vitro* el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4 de un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (a') poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo, o un compuesto derivado o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6; y una cadena ligera que comprende las tres CDR, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 7, 8, 9, y (b') cuantificar el nivel de fijación del anticuerpo a CXCR4 en dicha muestra.

Particularmente, la presente exposición se refiere a un procedimiento para la determinación *in vitro* del nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4 de un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a') poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o un fragmento funcional del mismo, según la invención; y

(b') cuantificar el nivel de anticuerpo que se une a CXCR4 en dicha muestra.

En una forma de realización preferida, el nivel de expresión de CXCR4 se mide por técnicas de inmunohistoquímica (IHC).

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un tumor que expresa de CXCR4 o de determinación *in vitro* del pronóstico para el desarrollo de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (i) determinación del nivel de expresión de CXCR4 según la presente invención, en particular haciendo participar a los anticuerpos humanizados de la presente invención, y (ii) comparar el nivel de expresión de la etapa (i) con un nivel de expresión de referencia de CXCR4 procedente del tejido normal.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un procedimiento para la determinación *in vitro* del estado de CXCR4 de un tumor de un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (1) determinación del nivel de expresión de CXCR4, en particular que implica anticuerpos humanizados de la presente invención, (2) puntuación de dicho tumor para el nivel de expresión de CXCR4, y (3) comparación de dicha puntuación con la obtenida a partir de una muestra de referencia.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un procedimiento para determinar si un trastorno oncogénico es susceptible al tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a) determinación *in vitro* del estado de CXCR4 de un tumor de un paciente; y

(b) determinar que, si el estado es CXCR4(+), el trastorno oncogénico es susceptible al tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento o derivado del mismo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antitumorales antagonistas de CXCR4 que comprende las etapas siguientes:

- a) seleccionar las células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o a un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 7, 8, 9, y
- c) determinar en las moléculas ensayadas su potencial de inhibición del enlace entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, a CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En este aspecto, se da a conocer un procedimiento para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antitumorales antagonistas de CXCR4, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- a) seleccionar las células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o un fragmento funcional del mismo, según la invención, y
- c) determinar en las moléculas ensayadas su potencial de inhibición del enlace entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, a CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEC ID nº 7, 8, 9, estando dicho anticuerpo preferentemente marcado.

En este aspecto, la presente invención se refiere particularmente a un kit que comprende por lo menos una cadena pesada de anticuerpo humanizado y/o una cadena ligera de anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la invención, estando dicho anticuerpo preferentemente marcado.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit según la presente invención para determinar *in vitro* el estado de CXCR4 de un tumor, comprendiendo dicho kit además:

- i) un reactivo útil para detectar el grado de enlace entre dicho anticuerpo anti-CXCR4 y CXCR4; y
- ii) muestras positivas y negativas de referencia útiles para la puntuación del nivel de expresión de CXCR4.

Ventajosamente, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos se pueden inmovilizar sobre un soporte, en particular un chip de proteína. Uno de dichos chip de proteína se da a conocer en la presente memoria.

Ventajosamente, los chips de proteínas pueden utilizarse en los kits o accesorios necesarios para detectar y/o cuantificar la proteína CXCR4 en una muestra biológica.

Es preciso señalar que la expresión "muestra biológica" se refiere en la presente memoria a las muestras extraídas de un organismo vivo (en particular sangre, tejido, órgano u otras muestras extraídas de un mamífero, en particular el hombre) o cualquier muestra que probablemente contiene dicha proteína CXCR4 (tal como una muestra de células transformadas, si es necesario).

Dicho anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, puede estar en forma de inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado a fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos marcados de la invención, o los fragmentos funcionales de los mismos, comprenden, por ejemplo, conjugados de anticuerpos (inmunoconjugados), que se pueden combinar, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, α -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa-6 fosfato deshidrogenasa o con una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromo-desoxiuridina. Los marcadores fluorescentes pueden estar combinados también con los anticuerpos de la invención o fragmentos funcionales de los mismos, como por ejemplo en particular fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, proteína verde fluorescente (GFP), dansilo, umbeliferona, etc. En dichos conjugados, los anticuerpos de la invención o los fragmentos funcionales de los mismos se pueden preparar por procedimientos conocidos por un experto en la materia. Se pueden enlazar con enzimas o marcadores fluorescentes directamente; mediante un grupo espaciador o un grupo de enlace tal como polialdehído,

glutaraldehído, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA); o en presencia de agentes de fijación tales como los mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que llevan marcadores de fluoresceína se pueden preparar por reacción con un isotiocianato.

5 Otros conjugados también pueden incluir marcadores quimioluminiscentes tales como el luminol y dióxetano, marcadores bioluminiscentes, tales como luciferasa y luciferina, o marcadores radiactivos tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹ y yodo¹³¹. Los procedimientos existentes conocidos por un experto en la materia para radioisótopos de fijación a anticuerpos, ya sea directamente o a través de un agente quelante tal como el EDTA o DTPA mencionados anteriormente, se pueden utilizar como radioisótopos de diagnóstico. Por lo tanto debe mencionarse el marcaje con [¹²⁵I]Na por la técnica de la cloramina-T [Hunter W.M. y Greenwood.F.C (1962) *Nature* 194:495]; el marcaje con tecnecio^{99m} descrito por Crockford *et al.* (patente US 4.424.200) o unido a través de DTPA descrito por Hnawich (patente US 4.479.930).

10 También se describe la utilización del anticuerpo de la invención como biomarcador. Los procedimientos pueden utilizarse para detectar o diagnosticar diversos trastornos oncogénicos hiperproliferativos relacionados con la expresión de CXCR4 ejemplificados por, pero no limitados a cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, osteosarcomas, neuroblastoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfomas, cáncer renal, glioblastoma, cáncer de tiroides, rhabdomiosarcoma, o cualquier otro cáncer relacionado con la expresión de CXCR4. Como apreciará cualquier experto en la materia, el nivel de expresión de anticuerpos relacionado con un trastorno específico variará en función de la naturaleza y/o la gravedad de la enfermedad preexistente.

15 La administración de los anticuerpos de la presente invención en cualquiera de las formas convencionales conocidas por un experto en la materia (p. ej., tópica, parenteral, intramuscular, etc.), proporcionará un procedimiento sumamente útil de detección de células displásicas en una muestra, así como permitir que un médico haga el seguimiento del régimen terapéutico de un paciente sometido a tratamiento de un trastorno hiperproliferativo relacionado con la expresión de CXCR4 o en el que ésta actúa como mediadora.

20 En otra forma de realización, la exposición se refiere a una composición farmacéutica para el diagnóstico por la imagen *in vivo* de un trastorno oncogénico relacionado con la expresión de CXCR4 que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmentos del mismo que está marcado y que se une a CXCR4 *in vivo*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 El anticuerpo de la invención, o un fragmento funcional o un derivado del mismo, encontrará utilización en varios propósitos médicos o de investigación, como por ejemplo la detección, diagnóstico y estadificación de diversas patologías relacionadas con la expresión de CXCR4.

30 La determinación del estadio tiene valor potencial de pronóstico y proporciona criterios para el diseño de un tratamiento óptimo [Simpson *et al. J. Clin. Oncology* 18:2059 (2000)]. Generalmente, la estadificación patológica del cáncer de mama por ejemplo, es preferible a la estadificación clínica debido a que el primero da un pronóstico más preciso. Sin embargo, se preferiría la estadificación clínica si fuera tan precisa como la estadificación patológica, porque no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para la determinación patológica.

35 Cuando se utiliza con marcadores adecuados u otra biomolécula detectable apropiada o productos químicos, el anticuerpo de la invención es particularmente útil para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* y las aplicaciones en pronósticos.

40 Los marcadores para utilización en inmunoanálisis son generalmente conocidos por los expertos en la materia y comprenden enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, entre otras partículas coloreadas tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoanálisis adecuados comprenden ensayos inmunosorbentes con enzima ligada (ELISA). Varios tipos de marcadores y procedimientos de conjugación de marcadores a los anticuerpos de la invención son bien conocidos por los expertos en la materia, tales como los que se exponen a continuación.

45 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "un trastorno oncogénico relacionado con la expresión de CXCR4" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado la presencia de niveles altos o niveles anormalmente bajos de CXCR4 (anormales) en un paciente que padece el trastorno que es o que se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Alternativamente, dichos trastornos pueden ser demostrados, por ejemplo, por un aumento en los niveles de CXCR4 en la superficie celular en las células o tejidos afectados de un paciente que padece el trastorno. El aumento en los niveles de CXCR4 se puede detectar, por ejemplo, utilizando el anticuerpo 515H7 o hz515H7 de la invención. Más, se refiere a células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, de forma que presentan un fenotipo de crecimiento anómalo caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular.

Alternativamente, las células pueden expresar niveles normales de CXCR4, pero se caracterizan por la proliferación anormal.

5 En determinadas formas de realización, "aumento de la expresión" en relación con CXCR4 se refiere a la proteína o a los niveles de expresión génica que demuestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión (medido por la expresión del ARN o la expresión de proteínas) con respecto a una referencia.

10 Más particularmente, se considera la utilización de un anticuerpo, o de un fragmento funcional o derivado del mismo, como se describe, para el diagnóstico *in vitro* de un trastorno oncogénico relacionado con la expresión de CXCR4 o la determinación *in vitro* del pronóstico para el desarrollo de un trastorno oncogénico relacionado con la expresión de CXCR4, por ejemplo, un cáncer relacionado con la expresión de CXCR4.

15 Otro aspecto amplio se refiere a un procedimiento de diagnóstico del trastorno patológico hiperproliferativo oncogénico o de una sensibilidad a un estado patológico relacionado con la expresión de CXCR4 en un paciente que comprende determinar la presencia o ausencia de dichas células que llevan CXCR4 en una muestra, y el diagnóstico de una enfermedad o la sensibilidad a una afección patológica sobre la base de la presencia o ausencia de células que llevan dicha CXCR4. Las utilizaciones en diagnósticos del anticuerpo de la invención comprenden tumores primarios, metástasis de cánceres, células madre de cáncer. El anticuerpo puede estar presente en forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado a fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

20 Más particularmente, se proporciona un procedimiento de detección *in vitro* de la presencia y/o la localización de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según la invención, y (b) detectar la fijación de dicho anticuerpo a la muestra. Otro aspecto del asunto es el seguimiento de la expresión de CXCR4 en respuesta a una terapia dirigida a CXCR4 durante los ensayos clínicos, y más particularmente cuando la disminución y o degradación del receptor CXCR4 es uno de los componentes del mecanismo de acción del compuesto ensayado.

25 Como será evidente para el experto en la materia, la detección de la fijación del anticuerpo de la invención puede ponerse de manifiesto mediante diversos ensayos. Aunque cualquier medio para la realización de los ensayos es compatible con la invención, se puede mencionar, como ejemplos, FACS, ELISA o IHC.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" pretende significar cualquier fluido biológico, célula, tejido, órgano o parte del mismo, que incluye o posiblemente incluye una célula neoplásica, tal como una célula de colon, gástrica, del recto, de mama, de ovario, de próstata, de riñón, de pulmón, de sangre, del cerebro, de piel, de tiroides, de ganglio linfático, de médula ósea u otro órgano o tejido que contiene o se sospecha que contiene una célula neoplásica. El término comprende las muestras presentes en un individuo, así como las muestras obtenidas o procedentes de la persona. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección histológica de una muestra obtenida por biopsia, o células que se colocan en cultivo de tejidos o se adaptan al mismo. Una muestra adicional puede ser una fracción subcelular o extracto, o un crudo o molécula de ácido nucleico sustancialmente pura o preparación de proteínas.

35 La muestra clínica se pretende que abarque una variedad de tipos de muestras obtenidas de un paciente y útiles en dicho procedimiento, tal como, por ejemplo, una prueba de diagnóstico o seguimiento de la determinación o detección de los niveles de expresión de CXCR4. La definición abarca las muestras de tejidos sólidos obtenidos por extirpación quirúrgica, una muestra de patología, una muestra archivada o una muestra de biopsia, cultivos de tejidos o células procedentes de los mismos y la descendencia de la misma, y secciones o frotis preparados a partir de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos no restrictivos son las muestras obtenidas del colon, estómago, recto, mama, ovario, próstata, riñón, pulmón, sangre, cerebro, piel, tiroides, ganglio linfático, médula ósea, etc. La definición también abarca muestras líquidas de origen biológico, y puede referirse a las células o fragmentos de células suspendidos en las mismas, o al medio líquido y sus solutos.

40 Otro aspecto se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor de un paciente que expresa CXCR4, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (a) poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según la invención, y (b) cuantificar la cantidad de anticuerpo que se une a CXCR4 en dicha muestra.

45 Como será evidente para el experto en la materia, la cantidad de anticuerpo que se une a CXCR4 puede cuantificarse de numerosas maneras, tales como mediante diversos ensayos. Aunque cualquier medio para la realización de los ensayos es compatible con la exposición, un procedimiento preferido pone en juego procedimientos inmunoenzimáticos según la técnica de ELISA, por la técnica de inmunofluorescencia, por inmunohistoquímica o radio-inmunoanálisis (RIA) o equivalente.

50 Preferentemente, la muestra biológica está formada por un fluido biológico, tal como suero, sangre completa, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano. La muestra, puede incluir, por ejemplo, tejido de biopsia, en el que puede estar convenientemente analizada la presencia de un trastorno oncogénico

hiperproliferativo patológico relacionado con la expresión de CXCR4.

Una vez realizada una determinación de la cantidad de CXCR4 presente en la muestra de ensayo, los resultados pueden compararse con los de las muestras de referencia, que se obtienen de una manera similar a las muestras de prueba, pero a partir de individuos que no tienen o presentan un trastorno oncogénico hiperproliferativo relacionado con la expresión de CXCR4. Si el nivel de la CXCR4 es significativamente elevada en la muestra de ensayo, se puede concluir que hay un aumento de la probabilidad de que el paciente del que procedía tenga o desarrolle dicho trastorno.

Más particularmente, se proporciona un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un tumor que expresa CXCR4 o la determinación *in vitro* del pronóstico para el desarrollo de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes (i) determinar el nivel de expresión de CXCR4 como se ha descrito anteriormente, y (ii) comparar el nivel de expresión de la etapa (i) con un nivel de expresión de referencia de CXCR4 a partir de tejido normal o un tejido que no expresa CXCR4.

"Diagnosticar" una enfermedad tal como se utiliza en la solicitud pretende incluir, por ejemplo, diagnosticar o detectar la presencia de un trastorno patológico hiperproliferativo oncogénico relacionado con o actuando como mediador la expresión de CXCR4, el seguimiento de la evolución de la enfermedad, y la identificación o la detección de células o muestras que son indicativas de un trastorno relacionado con la expresión de CXCR4.

"Pronóstico", como se utiliza en la presente solicitud significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción de la probable evolución o desenlace clínico de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un paciente es positiva para la tinción con el anticuerpo de la invención, entonces el "pronóstico" para ese paciente es mejor que si la muestra fuese negativa para la tinción de CXCR4. Las muestras pueden puntuarse para los niveles de expresión de CXCR4 en una escala adecuada, como se detallará más después.

Sin embargo otro aspecto está relacionado con el seguimiento de la expresión de CXCR4 para compuestos terapéuticos que producen una degradación de CXCR4 como uno de sus mecanismos de actuación. En ese caso la expresión de CXCR4 resultante en la membrana celular puede ser una herramienta fundamental para determinar la eficacia del tratamiento durante los ensayos clínicos y las terapias "personalizadas".

El nivel de expresión de CXCR4 se compara o se mide con ventaja en relación a los niveles en una célula de referencia o de muestra también denominada "nivel de referencia" o "nivel de expresión de referencia". "Nivel de referencia" "nivel de expresión de referencia", "nivel de control" y "control" se utilizan indistintamente en la memoria. En términos generales, un "nivel de control" significa un nivel básico independiente medido en una célula de referencia comparable, que está generalmente sin enfermedad ni cáncer. Puede ser del mismo individuo o de otro individuo quien está normal o no presenta la misma enfermedad de la que se obtiene la muestra de enfermo o de ensayo. En el contexto de la presente exposición, la expresión "nivel de referencia" se refiere a un "nivel de control" de expresión de CXCR4 utilizada para determinar un nivel de prueba de expresión de CXCR4 en una muestra que contiene células del cáncer de un paciente. Por ejemplo, cuando el nivel de CXCR4 en la muestra biológica de un paciente es mayor que el nivel de referencia de CXCR4, se considerará que las células tienen un alto nivel de expresión, o sobreexpresión, de CXCR4. El nivel de referencia puede determinarse por un gran número de procedimientos. Los niveles de expresión pueden definirse por lo tanto las células que llevan CXCR4 o, alternativamente, el nivel de expresión de CXCR4 independiente del número de células que expresan CXCR4. Por lo tanto, el nivel de referencia para cada paciente puede proscribirse por una relación de referencia de CXCR4, en el que la relación de referencia se puede determinar por cualquiera de los procedimientos para la determinación de los niveles de referencia descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede tomar una variedad de formas. Puede ser un solo valor umbral, tal como una mediana o la media. El "nivel de referencia" puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada paciente de forma individual, o el nivel de referencia puede variar, según las subpoblaciones específicas de pacientes. Así, por ejemplo, los hombres mayores pueden tener un nivel de referencia diferente que los hombres más jóvenes para el mismo tipo de cáncer, y las mujeres pueden tener un nivel de referencia diferente que los hombres para el mismo tipo de cáncer. Alternativamente, el "nivel de referencia" se puede determinar midiendo el nivel de expresión de CXCR4 en células de cáncer no oncogénico del mismo tejido como el tejido de las células neoplásicas que van a analizarse. Además, el "nivel de referencia" podría ser una determinada proporción de CXCR4 en las células neoplásicas de un paciente con respecto a los niveles de CXCR4 en células no tumorales en el mismo paciente. El "nivel de referencia" también puede ser un nivel de CXCR4 de las células cultivadas *in vitro*, que puede manipularse para simular las células tumorales, o puede manipularse de cualquier otra forma que produce niveles de expresión que determinan con precisión el nivel de referencia. Por otra parte, el "nivel de referencia" se puede establecer sobre la base de grupos comparativos, tales como en grupos que no tienen niveles elevados de CXCR4 y grupos que tienen niveles elevados de CXCR4. Otro ejemplo de los grupos comparativos sería de grupos que tienen una determinada enfermedad, afección o síntomas y grupos sin la enfermedad. El valor predeterminado se puede clasificar, por ejemplo, donde una población ensayada se divide en partes iguales (o desiguales) en grupos, como por ejemplo un grupo en situación de riesgo bajo, un grupo en situación de riesgo medio y un grupo en situación de riesgo alto o en cuartiles o quintiles, siendo el cuartil o quintil más bajo los

individuos en situación de riesgo más bajo o mayor cantidad de CXCR4 y siendo el cuartil o quintil más alto los individuos en mayor situación de riesgo o menor cantidad de CXCR4.

5 El nivel de referencia puede determinarse también por comparación del nivel de CXCR4 en poblaciones de
pacientes que tienen el mismo tipo de cáncer. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por análisis de histograma, en
el que toda una cohorte de pacientes se representan gráficamente, en donde un primer eje representa el nivel de
CXCR4, y un segundo eje representa el número de pacientes en la cohorte cuyas células tumorales expresan
CXCR4 a un nivel determinado. Dos o más grupos independientes de pacientes pueden determinarse por
10 identificación de subgrupos de poblaciones de la cohorte que tienen los mismos o similares niveles de CXCR4. La
determinación del nivel de referencia se puede hacer entonces sobre la base de un nivel que distingue mejor estos
grupos separados. Un nivel de referencia también puede representar los niveles de dos o más marcadores, uno de
los cuales es CXCR4. Dos o más marcadores pueden representarse, por ejemplo, por una relación de valores para
los niveles de cada marcador.

15 Del mismo modo, una población aparentemente sana tendrá un intervalo "normal" diferente que tenga una población
que se sabe que tiene una afección asociada con la expresión de CXCR4. Por consiguiente, el valor predeterminado
seleccionado puede tener en cuenta la categoría en la que cae un individuo. Intervalos y categorías apropiados se
pueden seleccionar sin más que experimentación rutinaria por cualquier experto en la materia. Por "elevado"
20 "aumentado" se entiende alto con relación a una referencia seleccionada. Normalmente, la referencia estará basada
en individuos normales aparentemente sanos en un grupo de edad apropiado.

Se entenderá además que dichas referencias pueden ser, además de los valores predeterminados, muestras de
materiales ensayados en paralelo con los materiales experimentales. Los ejemplos comprenden tejido o células
obtenidas al mismo tiempo del mismo paciente, por ejemplo, partes de una sola biopsia, o partes de una muestra de
25 sola célula del paciente.

En el diagnóstico clínico o seguimiento de los pacientes con enfermedades en las que CXCR4 interviene como
mediador, la detección de células que expresan CXCR4 o un aumento en los niveles de CXCR4, en comparación
con los niveles en una muestra biológica correspondiente de un paciente normal o de tejido no canceroso es
30 generalmente indicativo de un paciente con un trastorno en el que CXCR4 interviene como mediador o se sospecha
que lo presenta.

Según lo anterior, se proporciona un procedimiento para predecir sensibilidad al cáncer, comprendiendo dicho
procedimiento el detectar el nivel de expresión de CXCR4 en una muestra de tejido, indicando su presencia
35 sensibilidad al cáncer, en el que el grado de expresión de CXCR4 se correlaciona con el grado de sensibilidad. Por
lo tanto, en formas de realización específicas, se examina la expresión de CXCR4 en, por ejemplo, tejido mamario,
tejido de ovario, tejido de próstata, tejido pancreático, tejido cutáneo, tejido del esofágico, tejido pulmonar, tejido de
la cabeza y el cuello, tejido de la vejiga, tejido colorrectal, tejido de osteosarcoma, tejido de neuroblastoma, células
de leucemia linfoblástica aguda, células de leucemia mielocítica aguda, células de leucemia mielocítica crónica,
40 células de leucemia linfocítica crónica, células de mieloma múltiple, células de linfoma, tejido renal, tejido de
glioblastoma, tejido tiroideo, tejido de rhabdomiocarcinoma, o cualquier otro tejido que se sospecha de células que
expresan CXCR4, proporcionando la presencia de CXCR4 en la muestra una indicación de sensibilidad al cáncer o
la aparición o existencia de un tumor específico en el tejido.

45 También se proporciona un procedimiento para determinar la agresividad del tumor. En una forma de realización, un
procedimiento para observar la evolución de una enfermedad maligna en un individuo a lo largo del tiempo
comprende determinar el nivel de CXCR4 expresado por células en una muestra del tumor, comparar el nivel así
determinado con el nivel de CXCR4 expresado en una muestra de tejido equivalente tomada del mismo individuo en
un momento diferente, en el que el grado de expresión de CXCR4 en la muestra de tumor a lo largo del tiempo
50 proporciona información sobre la evolución del cáncer.

Aún en otra forma de realización, la aplicación proporciona procedimientos para determinar el protocolo terapéutico
apropiado para un paciente.

55 La presencia o ausencia o un cambio al nivel de CXCR4 puede ser indicativo de que el paciente es probable que
tenga una recaída o un cáncer avanzado o persistente relacionado con CXCR4. Por lo tanto, al medir un aumento en
el número de células que expresan CXCR4 o cambios en la concentración de CXCR4 presente en diversos tejidos o
células, es posible determinar si un régimen terapéutico determinado dirigido a mejorar un tumor maligno
relacionado con CXCR4 es eficaz.

60 Otro asunto de la presente exposición es un procedimiento *in vivo* de diagnóstico por la imagen de un trastorno
oncogénico relacionado con la expresión de CXCR4. Por ejemplo, dicho procedimiento se puede utilizar en un
paciente que presenta síntomas de un trastorno oncogénico. Si el paciente tiene, por ejemplo, aumento de los
niveles de expresión de CXCR4, entonces es probable que el paciente padezca un trastorno canceroso. Además, el
65 procedimiento puede ser útil para el seguimiento de la evolución y/o la respuesta al tratamiento en los pacientes que
han sido diagnosticados anteriormente de un cáncer en el que interviene CXCR4 como mediador. De acuerdo con el

objetivo anterior, se proporciona un reactivo de diagnóstico por la imagen *in vivo* que comprende un anticuerpo según la invención, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferentemente marcado, especialmente radiomarcado así como su utilización en diagnóstico médico por la imagen. Por lo tanto, un procedimiento general funciona administrando a un paciente una cantidad eficaz para el diagnóstico por la imagen de un reactivo de diagnóstico por la imagen tal como el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente que está marcado y un vehículo farmacéuticamente eficaz y a continuación detectando el agente una vez se ha unido a CXCR4 presente en la muestra. En determinadas formas de realización, el procedimiento funciona administrando una cantidad eficaz para el diagnóstico por la imagen de un agente de diagnóstico por la imagen que comprende un resto objetivo y un resto activo. El agente de diagnóstico por la imagen se administra en una cantidad eficaz para su utilización para diagnóstico en un mamífero tal como una persona y a continuación se detecta la localización y acumulación del agente de diagnóstico por la imagen. La localización y acumulación del agente de diagnóstico por la imagen pueden detectarse por gammagrafía, radiogammagrafía, resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computarizada, método de rayos X o de resonancia magnética, detección por fluorescencia y detección por quimioluminiscencia.

En lo que respecta al desarrollo de la terapia antitumoral específica, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas da información *in situ* sobre el nivel de expresión del receptor y por lo tanto permite seleccionar a los pacientes susceptibles de ser tratados siguiendo el nivel de expresión de los receptores necesarios para dicho tratamiento.

Para la inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales, la respuesta al tratamiento en función del nivel de expresión dirigido al receptor como el tratamiento con trastuzumab cuando la determinación de la sobreexpresión de Her2 en el carcinoma de mama es ahora de gran importancia clínica con la aparición del anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado trastuzumab. La demostración de la sobreexpresión de Her2 es un requisito previo para el tratamiento con trastuzumab, ya que actúa focalizando específicamente células de carcinoma que sobreexpresan Her2. Las pruebas exactas para Her2 tienen como objetivo garantizar que no se da tratamiento con trastuzumab costoso y potencialmente tóxico a los pacientes con tumores que no sobreexpresan y que todos los pacientes que podrían beneficiarse de trastuzumab reciben el tratamiento adecuado.

La enseñanza con trastuzumab en relación con la selección de pacientes que sobreexpresaron Her2 demostró las ventajas de determinar el nivel de expresión del receptor cuando se utiliza un tratamiento con un anticuerpo monoclonal y para desarrollar, al mismo tiempo que un anticuerpo monoclonal terapéutico, un anticuerpo monoclonal que se puede utilizar para la selección de pacientes.

Como consecuencia, se proporciona un procedimiento para determinar *in vitro* el estado de CXCR4 de un tumor de un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (1) determinar el nivel de expresión de CXCR4 como se ha descrito anteriormente, (2) puntuar en dicho tumor el nivel de expresión de CXCR4, y (3) comparar dicha puntuación con la obtenida a partir de una muestra de referencia.

"Estado de CXCR4" en el sentido de la exposición, se refiere a la clasificación de los tumores a una clase positiva a CXCR4 [CXCR4 (+)] negativa a CXCR4 [CXCR4 (-)] basada en la determinación del nivel de expresión del gen CXCR4 determinada por cualquiera de los métodos tales como inmunohistoquímica (IHC), hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación de cromosomas *in situ* (CISH), chip genético u otros procedimientos conocidos por el experto en la materia.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo para diagnóstico ha de poder unirse al receptor específico cuando las muestras de tejido están, fijadas en formalina, fijadas en Glyco-fixx, empapadas en parafina y/o congeladas.

Más específicamente, el nivel de expresión de CXCR4 se mide por inmunohistoquímica (IHC).

A título de ejemplo, las muestras pueden puntuarse por los niveles de expresión de CXCR4 en una escala de 0 a 3+ para los niveles de tinción de anticuerpos, donde 0 es negativo y 1+ a 3+ representa una tinción positiva en cuatro etapas semicuantitativas de intensidad creciente. Las puntuaciones 1+ a 3+ se pueden recodificar como positivas, ya que cada puntuación positiva puede estar relacionada con un riesgo significativamente reducido de recaída y enfermedad mortal en comparación con la puntuación 0 (negativa), pero aumentos de intensidad entre las puntuaciones positivas pueden proporcionar una reducción de riesgo adicional. Cualquier método de análisis de riesgos convencional puede utilizarse para estimar el valor pronóstico de CXCR4. Los métodos de análisis representativos comprenden el análisis de regresión de Cox, que es un método semiparamétrico para el modelado de la supervivencia o datos de tiempo para que sucedan los casos en presencia de casos no tenidos en cuenta (Hosmer y Lemeshow, 1999; Cox, 1972). A diferencia de otros análisis de supervivencia, p. ej., Life Tables o Kaplan-Meier, Cox permite la inclusión de variables de predicción (covariables) en los modelos. La utilización de un método de análisis convencional, p. ej., Cox se puede ser capaz de poner a prueba hipótesis sobre la correlación del estado de expresión de CXCR4 en un tumor primario al tiempo para el inicio de cualquier recaída de la enfermedad (tiempo de supervivencia sin enfermedad, o tiempo para la enfermedad metastásica), o el tiempo hasta la muerte por la enfermedad (tiempo de supervivencia global). El análisis de regresión de Cox también se conoce como análisis de riesgos proporcionales de Cox. Este procedimiento está normalizado para probar el valor pronóstico de un marcador

tumoral en el tiempo de supervivencia del paciente. Cuando se utiliza en modo multifactorial, los efectos de varias covariables se ensaya en paralelo, de modo que las covariables individuales que tienen un valor pronóstico independiente pueden identificarse, es decir, los marcadores más útiles. El término "estado de CXCR4" positivo o negativo [también conocido como CXCR4 (+) o CXCR4 (-)] de los tumores se refiere a puntuaciones de 0 o puntuaciones 1+ a 3+, respectivamente.

Una muestra puede ser "puntuada" durante el diagnóstico o el seguimiento del cáncer de mama. En su forma más simple, la puntuación puede clasificarse en negativa o positiva a juzgar por el examen visual de las muestras por inmunohistoquímica. Una puntuación más cuantitativa implica considerar la intensidad de la tinción en dos parámetros y la proporción de células teñidas ("positivas") que se toman muestras. Basándose de estos dos parámetros pueden asignarse números que reflejan el aumento de los niveles de tinción positiva. Allred *et al.* (Allred, Harvey *et al.* 1998) han descrito una forma de conseguir esto, que implicaba puntuar ambos parámetros en una escala de 0 (negativo) a 3+, y resumiendo las puntuaciones de cada uno de los parámetros para una puntuación global. Esto se traduce en una escala con posibles puntuaciones de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. (Téngase en cuenta que una puntuación de 1 no es posible en la escala de Allred). Un método de puntuación algo más simple integra la intensidad de la tinción nuclear y la proporción de células que presentan núcleos teñidos en una escala combinada de 0 a 3+. Cualquiera de los procedimientos de puntuación se puede aplicar a la intensidad de puntuación y la proporción de tinción de Stat5 activado en los núcleos celulares. Las expresiones "estado de CXCR4" positivo o negativo de los tumores utilizadas en la presente descripción se refiere a los niveles de expresión de CXCR4 que corresponden a las puntuaciones de 0 o 1+ a 3+ en la escala simplificada, respectivamente.

Generalmente, los resultados de una prueba o ensayo se pueden presentar en cualquiera de una variedad de formatos. Los resultados se pueden presentar de un modo cualitativo. Por ejemplo, el informe de la prueba puede indicar sólo si se detectó o no un polipéptido determinado, quizá también con una indicación de los límites de detección. Los resultados se pueden presentar en un modo semicuantitativo. Por ejemplo, pueden definirse varios intervalos, y los intervalos se pueden asignar una puntuación (p. ej., 1+ a 3+) que proporciona un determinado grado de información cuantitativa. Dicha puntuación puede reflejar varios factores, p. ej., el número de células en las que se detecta CXCR4, la intensidad de la señal (lo que puede indicar el nivel de expresión de CXCR4 o de las células que llevan CXCR4), etc. Los resultados se puede presentar en modo cuantitativo, p. ej., como porcentaje de células en las que se detecta el polipéptido (CXCR4), como una concentración de proteína, etc., Como apreciará cualquier experto en la materia, el tipo de resultado proporcionado por una prueba variará en función de las limitaciones técnicas de la prueba y la importancia biológica asociada a la detección del polipéptido. Por ejemplo, en el caso de determinados polipéptidos un resultado puramente cualitativo (p. ej., si se detecta o no el polipéptido en un determinado nivel de detección) proporciona información significativa. En otros casos es necesaria un resultado más cuantitativo (p. ej., una relación del nivel de expresión del polipéptido en la muestra que se ensaya con respecto al nivel normal).

En una forma de realización más preferida, la puntuación del nivel de expresión de CXCR4 se clasifica de 0 a 3+, basada en una determinación de la intensidad del producto de reacción y el porcentaje de células positivas. Para mayor claridad, la tabla 5 a continuación resume estos parámetros. Sólo se debe considerar la reactividad membranosa perimetral completa del tumor invasivo y a menudo tenía un aspecto de "tela metálica". Según las directrices actuales, las muestras puntuadas como dudosas (puntuación de 2+ o más) para CXCR4 IHC deben considerarse como CXCR4 (+) y necesitan someterse a una nueva determinación. El análisis IHC debe rechazarse, y se repite o se prueba por FISH o cualquier otro método si, a título de ejemplo no limitativo, los controles no son los esperados, los equipos afectan a la mayor parte de la muestra y la muestra tiene una fuerte positividad membranosa de los conductos normales de la mama (referencias internas) lo que sugiere la recuperación excesiva de antígenos.

Tabla 5

Estado de CXCR4	Descripción de IHC
0	Sin reactividad o reactividad membranosa en menos del 10% de las células tumorales.
1+	Se detecta reactividad membranosa apenas/escasamente perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células son inmunorreactivas sólo en parte de la membrana.
2+	Se observa reactividad membranosa completa débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.
3+	Se observa fuerte reactividad completa en más del 10% de las células tumorales.

Más preferentemente, dicha puntuación comprende la utilización de una escala apropiada basada de dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

En una forma de realización preferida, el procedimiento se refiere a una escala apropiada de 0 a 3+ en la que ninguna reactividad membranosa de las células tumorales se puntúa 0, y la fuerte reactividad completa en más del 10% de las células tumorales se puntúa 3+.

Con mayor detalle, como se ha descrito anteriormente, dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3, en la que ninguna reactividad membranosa de las células tumorales se puntúa 0; la reactividad membranosa apenas perceptible en más de 10% de las células tumorales se puntúa 1+; la reactividad membranosa completa débil a moderada en más de 10% de las células tumorales se puntúa 2+; y la fuerte reactividad completa en más del 10% de las células tumorales se puntúa 3+.

En un aspecto concreto, un tumor es CXCR4(+) con una puntuación de 2+. En un aspecto concreto, un tumor es CXCR4(+) con una puntuación de 3+. En otro aspecto concreto, un tumor es CXCR4(+) con una puntuación 2+ o 3+.

Se describe también un procedimiento de determinar si un trastorno oncogénico es sensible al tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: (a) determinar *in vitro* el estado CXCR4 de un tumor de un paciente como se ha descrito anteriormente, y (b) determinar que, si el estado es CXCR4(+), el trastorno oncogénico es sensible al tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento o derivado del mismo.

En otro aspecto, se considera un kit útil para dicho diagnóstico o procedimiento para pronóstico, comprendiendo dicho kit el anticuerpo de la invención.

Como una cuestión de conveniencia, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico, p. ej., los kits están también dentro del alcance de la invención. El kit contiene los anticuerpos para la detección y cuantificación de CXCR4 *in vitro*, p. ej., en un ELISA o una inmunotransferencia Western. El anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit para la detección y cuantificación de CXCR4 *in vitro*, p. ej., en un ELISA o una inmunotransferencia Western. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (p. ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Dicho kit puede comprender un receptáculo está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, sujetando dichos recipientes elementos separados de la invención. Por ejemplo, un recipiente puede contener un primer anticuerpo unido a un soporte insoluble o parcialmente soluble. Un segundo recipiente puede contener un segundo anticuerpo solubles, marcado de forma detectable, en forma liofilizada o en solución. El receptáculo puede contener también un tercer recipiente que contiene un tercer anticuerpo marcado de forma detectable en forma liofilizada o en solución. Un kit de esta naturaleza puede utilizarse en el ensayo de tipo sándwich de la invención. La etiqueta o el prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para la utilización de diagnóstico *in vitro* prevista.

Las cantidades relativas de los varios reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse en forma de polvos secos, normalmente liofilizados, como por ejemplo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Aún en un aspecto adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de fijación de los mismos tal como se detalla en la presente memoria se proporcionan marcados con un resto detectable, de tal manera que se pueden envasar y utilizar, por ejemplo, en kits, para diagnosticar o identificar células que tienen el antígeno mencionado anteriormente. Los ejemplos no restrictivos de dichos marcadores comprenden fluoróforos, tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionúclidos o enzimas. Dichos anticuerpos o fragmentos de fijación marcados pueden utilizarse para la localización histológica del antígeno, ELISA, la clasificación de células, así como otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar CXCR4, y células que llevan este antígeno, por ejemplo.

Se proporcionan también kits que son útiles como control positivo para ensayos de apoptosis, para la purificación o inmunoprecipitación de CXCR4 de las células. Para el aislamiento y purificación de CXCR4, el kit puede contener los anticuerpos descritos en la presente memoria o fragmentos de fijación a antígenos de los mismos acoplados a bolitas (p. ej., bolitas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de CXCR4 *in vitro*, p. ej., en un ELISA o una inmunotransferencia Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o relacionado con el mismo. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento de fijación del mismo de la invención. Pueden incluirse contenedores adicionales que contienen, p. ej., diluyentes y tampones, anticuerpos de referencia. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para la utilización para diagnóstico *in vitro* previsto.

Más específicamente, la invención se refiere a un kit para la determinación del estado de CXCR4 de un tumor por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. En una forma de realización preferida, como se describirá en el ejemplo, la invención se refiere a un kit para la determinación del estado de CXCR4 de un tumor por métodos IHC.

En una forma de realización específica, la invención consiste en un kit que comprende por lo menos un anticuerpo

anti-CXCR4, o un fragmento funcional o derivado del mismo, como se describe anteriormente, estando dicho anticuerpo preferentemente marcado.

5 Debe entenderse que el experto en la materia puede utilizar cualquier procedimiento de marcaje tal como, por ejemplo, la utilización de marcadores mencionados anteriormente.

10 En una forma de realización preferida, el kit según la invención, útil para detectar *in vitro* la presencia y/o la localización de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, comprende además un reactivo útil para detectar el grado de fijación entre dicho anticuerpo anti-CXCR4 y CXCR4.

10 En otra forma de realización preferida, el kit de la invención útil para determinar *in vitro* el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4, comprende además un reactivo útil para cuantificar el nivel de fijación entre dicho anticuerpo marcado y CXCR4.

15 En todavía otra realización, el kit según la invención útil para determinar *in vitro* el estado de CXCR4 de un tumor, comprende además:

- i) un reactivo útil para detectar el grado de fijación entre dicho anticuerpo marcado y CXCR4; y
- 20 ii) muestras de referencia positivas y negativas útiles para la puntuación del nivel de expresión de CXCR4.

25 Dicho kit para determinar *in vitro* el estado de CXCR4 de un tumor puede comprender además un anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos, preferentemente dicho anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos está marcado.

25 La presente exposición también se refiere a la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un fármaco para el reconocimiento específico de un compuesto que es biológicamente activo para las células que expresan o sobreexpresan CXCR4.

30 En el sentido de la presente descripción, un "compuesto biológicamente activo" es cualquier compuesto capaz de modular, especialmente inhibir, la actividad celular, en particular el crecimiento, proliferación, transcripción y traducción de genes.

35 La invención también se refiere a un reactivo de diagnóstico *in vivo* compuesto por un anticuerpo según la invención, o un fragmento funcional del mismo, preferentemente marcado, en particular radiomarcado, y su utilización en diagnóstico médico por la imagen, en particular para la detección de cáncer relacionado con la expresión o sobreexpresión celular de CXCR4.

40 La invención se refiere también a una composición como un producto de combinación o a un conjugado anti-CXCR4/toxina o un radioisótopo, según la invención, utilizado como fármaco.

Preferentemente, dicha composición como un producto de combinación o dicho conjugado se complementará con un excipiente y/o un vehículo farmacéutico.

45 En la presente descripción, "vehículo farmacéutico" significa un compuesto, o una combinación de compuestos, que se introducen en una composición farmacéutica que no causa reacciones secundarias y que, por ejemplo, facilita la administración de los principios activos, aumenta su vida útil y/o la eficacia en el organismo, aumenta su solubilidad en solución o mejora su almacenamiento. Dichos vehículos farmacéuticos son bien conocidos y un experto en la materia los adaptará según la naturaleza y la vía de administración de los principios activos seleccionados.

50 Preferentemente, dichos compuestos se administrarán por vía general, en particular por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea u oral. Más preferentemente, la composición compuesta por el anticuerpo según la invención se puede administrar en varias dosis espaciadas por igual a lo largo del tiempo.

55 Sus vías de administración y regímenes de dosificación y formas galénicas óptimas se pueden determinar según los criterios generalmente tenidos en cuenta al establecer un tratamiento adecuado para el paciente, tales como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, su la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios experimentados.

60 Por lo tanto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un fármaco para el reconocimiento específico de un compuesto que es biológicamente activo para las células que expresan o sobreexpresan CXCR4.

65 Como se ha demostrado anteriormente, los Mab CXCR4 según la invención tienen fuertes actividades en el campo del tratamiento del cáncer, por lo que dichos anticuerpos podrían utilizarse en ensayos de cribado para la identificación de agentes antitumorales antagonistas de CXCR4 destinados a tratar el cáncer. En la primera etapa de

5 estos ensayos, las células que expresan CXCR4 se incuban con los anticuerpos de la invención y a continuación, se pueden determinar el potencial de las moléculas para inhibir la fijación de los anticuerpos. Las células utilizadas en este tipo de ensayos pueden ser estirpes celulares transfectadas tales como CHO-CXCR4, NIH3T3-CXCR4 o estirpes celulares humanas transfectadas con CXCR4 tales como U373-MAG1-CXCR4, estirpes celulares humanas que expresan CXCR4 tales como NALM6 o células primarias tales como PBMC. El procedimiento utilizado para detectar antagonistas de anticuerpos que inhiben CXCR4 que se unen a células que expresan CXCR4 puede ser el ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA) competitivo a base de células como describe Zhao Q. *et al.* (*AIDS Research And Human Retroviruses*, 2003, 19, págs. 947-955) o los protocolos que utilizan clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), tal como se describe en Juárez J. *et al.* (*Leukemia* 2003, 17, págs. 1294-1300).

10 Por lo tanto, en un aspecto particular, se considera un procedimiento para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antitumorales antagonistas de CXCR4 que comprende las etapas siguientes:

- 15 a) seleccionar las células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de la invención, y
- 20 c) determinar en las moléculas ensayadas su potencial de inhibición de la fijación entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, a CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

25 Otras características y ventajas de la invención aparecerán además en la descripción con los ejemplos y figuras cuyas leyendas se presentan a continuación.

Leyendas de las figuras

30 Las figuras 1A y 1B muestran la expresión de CXCR4 y CXCR2 en células de cáncer por análisis RCP cuantitativo, respectivamente.

La figura 2 muestra la expresión de de las proteínas CXCR4 y CXCR2 en células de cáncer por análisis FACS.

35 Las figuras 3A y 3B muestran la competencia de la fijación específica de [¹²⁵I]SDF1 por SDF-1 no marcado (figura 3 A) y Mab 515H7 (figura 3B) en las membranas celulares de las células CHO-K1 que expresan de forma estable CXCR4 humana natural (T: fijación total; NS: fijación no específica).

40 La figura 4 muestra la modulación de la activación de la proteína G por Mab 515H7 mediante seguimiento de respuestas de fijación a [³⁵S]GTPγS en el receptor CXCR4 natural expresado de manera estable en células NIH-3T3.

45 La figura 5 muestra la modulación de la activación de la proteína G por el Mab 515H7 anti-CXCR4 mediante el seguimiento de respuestas de fijación a [³⁵S]GTPγS en células de tumor humanas HeLa estimuladas con SDF-1 (10 y 100 nM).

50 Las figuras 6A-6C muestran la modulación de la asociación receptor CXCR4 con diferentes parejas de interacción de SDF-1 y por Mab 515H7 por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK293. (figura 6A: homodimerización CXCR4: CXCR4; figura 6B: heterodimerización CXCR2: CXCR4 y figura 6C: recuperación de β-arrestina con CXCR4 como mediador).

Las figuras 7A y 7B muestran la inhibición de la producción de AMPc por SDF-1 y Mab 515H7 estimulada por forskolina en células NIH3T3 que expresan de forma estable el receptor CXCR4.

55 La figura 8 muestra la modulación de la activación de la proteína G por el Mab 515H7 anti-CXCR4 por seguimiento de respuestas de la fijación de [³⁵S]GTPγS al receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 mutante constitutiva activo expresado de forma estable en células CHO-K1.

60 La figura 9 muestra la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF-1 por CXCR4 Mab 515H7 *in vitro*.

La figura 10 muestra la inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto MDA-MB-231 por el Mab 515H7 anti-CXCR4 en ratones Nod/Scid.

65 Las figuras 11A-11C muestran la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 por el Mab 515H7 anti-CXCR4 en células CHO-CXCR4 (figura 11A) y MDA-MB-231 (figura 11B) y células cancerosas U937 (figura 11C).

La figura 12 muestra la actividad de Mab m515H7 murino anti-CXCR4 en el modelo U937 de supervivencia de ratones Nod/Scid.

5 La figura 13 muestra la actividad de Mab m515H7 murino anti-CXCR4 en la inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto KARPAS 299 de linfocitos T en ratones Nod/Scid.

10 La figura 14 muestra la competencia de LA UNIÓN específica de [¹²⁵I]SDF1 por Mab m515H7 murino y Mab c515H7 híbrido en las membranas celulares de las células CHO-K1 que expresan de forma estable CXCR4 humano natural (T: fijación total; NS: fijación no específica).

15 La figura 15 muestra la modulación de la activación de la proteína G por Mab m515H7 murino y por Mab c515H7 híbrido mediante el seguimiento de las respuestas de la fijación [³⁵S]GTPγS al receptor CXCR4 natural expresada de forma estable en células NIH-3T3 estimuladas con SDF-1 (10 nM).

La figura 16 muestra la modulación de la activación de la proteína G por Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y Mab c515H7 híbrido mediante seguimiento de respuestas de la fijación [³⁵S]GTPγS en células tumorales humanas HeLa estimuladas con SDF-1 (10 nM).

20 Las figuras 17A-17C muestran la modulación de la asociación del receptor CXCR4 con diferentes parejas de interacción de SDF-1 y por los Mab m515H7 y c515H7 por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en las células HEK293. (figura 17A: homodimerización CXCR4: CXCR4; figura 17B: heterodimerización CXCR2: CXCR4 y figuras 17C: recuperación de β-arrestina con CXCR4 como mediador).

25 Las figuras 18A y 18B muestran la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 en células CHO-CXCR4 (figura 18A) y en células U937 (figura 18B).

La figura 19 muestra la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF-1 por los Mab m515H7 y c515H7 anti-CXCR4 *in vitro*.

30 La figura 20 muestra la actividad del Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4 en el modelo U937 de supervivencia de ratones Nod/Scid.

35 La figura 21 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada 515H7 con las estirpes germinativas humanas IGHV3-49*04 e IGHJ4*01. La secuencia de aminoácidos VH de 515H7 está alineada con las secuencias marco del aceptador humano seleccionado. Las secuencias VH1 y VH2 (VH3 no está representada) corresponden a variantes humanizadas construidas del dominio VH de 515H7, con restos retromutados en negrita y representa una variante completamente humana. La variante 1 VH1 no lleva ningún resto posterior mutado y representa una variante completamente humana. La variante VH2 tiene 8 retromutaciones y es la variante más murina. La variante VH3 lleva 5 retromutaciones (no representadas).

45 La figura 22 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera 515H7 con las estirpes germinativas humanas IGKV4-1*01 e IGKJ1*01. La secuencia de aminoácidos VL de 515H7 está alineada con las secuencias marco del aceptador humano seleccionado. Las secuencias VL1 a VL3 corresponden a variantes humanizadas construidas del dominio VL de 515H7, con restos retromutados en negrita. La variante VL1 no lleva ningún resto mutado posterior y representa la variante más humana. La variante VL2 tiene 13 retromutaciones y es la variante más murina. La variante VL3 llevar 5 retromutaciones.

50 Las figuras 23A-23F muestran bloqueo transversal del anticuerpo 515H7 murino biotinilado por el híbrido 515H7 y las diferentes variantes del 515H7 humanizado. La actividad de las variantes humanizadas de 515H7 (hz515H7) para bloquear transversalmente el anticuerpo 515H7 murino original se determinó por citometría de flujo utilizando células NIH3T3 transfectadas con CXCR4. La actividad de las variantes humanizadas se comparó con el 515H7 híbrido. Las actividades de bloqueo transversal de las tres variantes diferentes de VH (VH1 - VH3) combinadas con el VL híbrido (cVL) fueron muy similares (figura 23 A - figura 23 C). No se determinó ninguna reducción en la actividad de la variante 1 de VH (VH1, variante sin retromutaciones) cuando se combina con la variante 1 y 2 de VL. Se detectó una reducción significativa de actividad para el montaje hz515H7 VH1 VL3.

60 La figura 24 muestra el análisis BRET para analizar la actividad de la variante VH1 VL1 del anticuerpo 515H7 humanizado. Se determinó la capacidad de la actividad de la 1 de VH variante 1 de VL del anticuerpo 515H7 humanizado (VH1 VL1 de hz515H7) para inhibir la transducción de señales con SDF-1 como mediador. Esta variante presentó sólo una inhibición menor de la transducción de señales con SDF-1 como mediador según se determinó por BRET. SDF-1 se utilizó a una concentración de 100 nM.

65 Las figuras 25A-25D muestran la comparación de diferentes mutantes de la VH1 con retromutaciones simples o dobles y combinaciones de diferentes variantes de VL con hz515H7 VH1 D76N. Se prepararon retromutaciones simples y dobles en el VH1 y se combinaron con la VL1. Estos montajes se determinaron en análisis BRET

(figuras 25A-25C). De estos retromutantes simples sólo el montaje con la retromutación D76N mostró un aumento de la inhibición de la transducción de señales con SDF-1 como mediador. Ninguno de los retromutantes dobles en VH tuvo fuerte actividad inhibitoria (figura 25C). El mutante D76N simple trasero de la VH1 se combinó con diferentes variantes del VL. La concentración de SDF-1 fue 100 nM.

5 La figura 26 muestra la clasificación de diferentes mutantes de la VH1 y VL1 con retromutaciones simples o dobles en comparación con el montaje VH1 D76N VL2. Las retromutaciones simples y dobles se prepararon en el VH1 y se combinaron con el VL1. Todos los montajes se determinaron en análisis BRET y se calculó su porcentaje de inhibición. La concentración de SDF-1 fue 100 nM.

10 Las figuras 27A-27B muestran inhibición de la fijación de SDF-1 por diferentes montajes de 515H7 humanizado y correlación entre los resultados obtenidos por FACS y BRET. Se probó la capacidad de las diferentes variantes del anticuerpo 515H7 humanizado con una fuerte actividad en el bloqueo de la recuperación de β -arrestina para inhibir la fijación de SDF-1 biotinilado en citometría de flujo (FACS) (A). Estos se compararon con VH1 y VL1. Los resultados del análisis por FACS se correlacionan con los resultados obtenidos por BRET (B).

15 La figura 28 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de VL2 de hz515H7 y otras versiones humanizadas VL2.1 de 515H7, VL2.2 de 515H7 y VL2.3 de 515H7. La secuencia de aminoácidos de VL 515H7 está alineada con las secuencias marco de aceptadores humanos seleccionados. Las secuencias VL2.1, VL2.2 y VL2.3 corresponden a variantes humanizadas construidas de la VL2 del 515H7 humanizado, con restos mutados en negrita. VL2.1 y VL2.2 llevan 4 restos más humanizados mientras que VL2.3 contiene 5 restos más humanos.

20 Las figuras 29A-29C muestran la fijación específica de los Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 VL2.2 D76N y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) a CXCR4 en NIH3T3-CXCR4 (figura 29A) U937 (figura 29B) y células de Ramos (figura 29C).

25 Las figuras 30A-30D y 31 muestran la modulación de la activación de la proteína G por Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2 [Fig. 30A], hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [Fig. 30B], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [Fig. 30C] y hz515H7 VH1 D76N VL2.3 [Fig. 30D]) mediante el seguimiento de las respuestas de la fijación de [35 S]GTPyS al receptor CXCR4 natural expresado de forma estable en células NIH-3T3 estimuladas con SDF-1 (10 nM o 100 nM).

30 Las figuras 32A-32C muestran la modulación la asociación del receptor CXCR4 con diferentes parejas de interacción por SDF-1 y por los Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK293. (figura 32A: homodimerización CXCR4: CXCR4; figura 32B: heterodimerización CXCR2: CXCR4 y figura 32C: recuperación de β -arrestina con CXCR4 como mediador).

35 Las figuras 33A-33D ilustran tumores de xenoinjertos de Ramos y KARPAS299 fijados en Glyofixx con a) y c) tinción IHC utilizando 515H7 / b) y d) tinción IHC utilizando mlgG1.

40 Las figuras 34A-34D ilustran tumores de xenoinjertos de Ramos y KARPAS299 fijados en formol con a) y c) tinción IHC utilizando 515H7 / b) y d) tinción IHC utilizando mlgG1.

45 Las figuras 35A-35D muestran la competencia de la fijación específica de [125 I]SDF1 por Mab hz515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2 [Fig. 35A y B], hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [Fig. 35A y 35C], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [Fig. 35A y 35D], VH1 hz 515H7 D76N VL2.3 [Fig. 35A]) en las membranas celulares de células CHO-1 que expresan de forma estable CXCR4 humano natural (T: fijación total; NS: fijación no específica).

50 La figura 36 muestra la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 en las células U937 por Mab hz515H7 VH1 D76N VL2.

55 Las figuras 37A-37B muestran la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF-1 por Mab hz515H7 humanizado VH1 D76N VL2 con CXCR4 *in vitro*.

Figura 38: Tumores de xenoinjertos de Ramos y KARPAS299 fijados en Glyofixx con a) y c) tinción IHC utilizando hz515H7 VH1 D76N VL2 biotinilado y b) y d) tinción IHC utilizando hlgG1 biotinilada.

60 Figura 39: Tumores de xenoinjertos de Ramos y KARPAS299 fijados en formol con a) y c) tinción IHC utilizando hz515H7 VH1 D76N VL2 biotinilado y b) y d) tinción IHC utilizando hlgG1 biotinilada.

65 La figura 40 muestra el efecto de Mab 515H7 híbrido (c515H7) en el crecimiento del tumor de xenoinjerto de linfocitos B de Ramos en ratones Scid.

La figura 41 muestra el efecto de la versión Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 en el crecimiento del tumor de

xenoinjerto de linfocitos B de Ramos en ratones Scid.

La figura 42 muestra el efecto de la versión Mab hz515H7 VH1 D76N VL2.1 en el crecimiento del tumor de xenoinjerto de linfocitos B de Ramos en ratones Scid.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de CXCR4 y CXCR2 en células cancerosas

10 - Análisis Q-RPC:

Con el fin de cuantificar la expresión relativa de CXCR4 y CXCR2 en diferentes estirpes celulares de cáncer, se utilizó RT-RCP en tiempo real.

15 Se extrajeron muestras de ARN de diferentes estirpes celulares utilizando RNeasy Mini o Midi Protocols (Qiagen Corporation, Francia). Las muestras de ARN se controlaron a continuación utilizando el sistema de electroforesis automatizada Experion (Bio-Rad Corporation, Francia) y presentaban una buena calidad/integridad. Un µg de cada muestra de ARN se convirtió en plantilla de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad Corporation, Francia). Las concentraciones de ADNc se determinaron cuantitativamente utilizando qRCP, ya sea con una sonda TaqMan para CXCR2 o SYBERGreen para CXCR4. La comparación de las muestras requiere normalización, por lo que se introdujo la referencia interna RPL0. Las sondas TaqMan (utilizadas para CXCR2) llevaban una "etiqueta indicadora 5' FAM y un grupo extintor 3' TAMRA. La enzima de RCP se activó por calentamiento durante 2 min a 50°C y 10 min a 95°C. Se utilizó un procedimiento de dos etapas, 15 seg a 95°C y 1 min a 62°C durante 40 o 45 ciclos en una mezcla de RCP que contenía 5 µl de plantilla de ADNc (dilución 1/20), 1 x qRCP Mastermix (TaqMan UniversalPCR Master Mix, Applied Biosystems Corporation, Branchburg New Jersey, EE.UU.), de 50 a 900 nM de cada uno de los cebadores y sonda 50 a 100 nM en un volumen total de 50 µl. Todas las reacciones se realizaron utilizando el instrumento iCycler (Bio-Rad Corporation). La Q-RPC permitió determinar el umbral de ciclo (Ct). Cuanto más pequeño es el valor Ct, más se expresa el gen de la prueba. Los cebadores y sonda para la proteína ribosómica humana, grande, P0 fueron:

30

cebador directo, 5'-GAAACTCTGCATTCTCGCTTCCTG-3' (SEC ID nº 63);
 cebador inverso, 5'-AGGACTCGTTTGTACCCGTTGA-3' (SEC ID nº 64);
 sonda, 5'-(FAM)-TGCAGATTGGCTACCCAAGTTCGCA-(TAMRA)-3' (SEC ID nº 65).

35 Los cebadores para CXCR4 humano (receptor 4 de quimiocinas) fueron los siguientes:

cebador directo, 5'-CTCCTTCATCCTCCTGGAAATC-3' (SEC ID nº 66);
 cebador inverso, 5'-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-3' (SEC ID nº 67).

40 Los cebadores y sonda para CXCR2 humano (receptor 2 de quimiocinas) fueron los siguientes:

cebador directo, 5'-GTGGTCATTATCTATGCCCTGG-3' (SEC ID nº 68);
 cebador inverso, 5'-CGACCCTGCTGTATAAGATGAC-3' (SEC ID nº 69);
 sonda, 5'-(FAM)-TATTCCTGCTGAGCCTGCTGGAAA-(TAMRA)-3' (SEC ID nº 70).

45

En el estudio comparativo de los inventores, la expresión de dos genes [el gen probado (CXCR4 o CXCR2) y RPL0] se determinó cuantitativamente en dos muestras diferentes: la estirpe celular probada y una estirpe celular de referencia. La estirpe celular de referencia correspondía a la estirpe celular que contenía la expresión más baja del gen cuantificado. El cálculo de la expresión génica comparativo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

50

Expresión génica relativa = $(1 + E_{\text{gen}})^{-\Delta Ct(1)} / (1 + E_{\text{RPL0}})^{-\Delta Ct(2)}$
 E_{gen} = eficiencia de la RCP utilizando cebadores/sonda del gen cuantificado
 E_{RPL0} = eficiencia de la RCP utilizando los cebadores/sonda RPL0
 Ct = ciclo umbral
 $\Delta Ct(1)$ = Ct_{gen} (estirpe celular probada) - Ct_{gen} (estirpe celular de referencia)
 $\Delta Ct(2)$ = Ct_{RPL0} (estirpe celular probada) - Ct_{RPL0} (estirpe celular de referencia)

55

Para cada serie de RCP, se calculó un valor relativo de cantidad de genes, y las estirpes celulares de cáncer se clasificaron en grupos teniendo en cuenta sus niveles de expresión desde el más alto al negativo. Todos los datos se presentan en las figuras 1A y 1B. Todas las estirpes celulares de cáncer ensayadas expresaron CXCR4 (figura 1A) y CXCR2 exceptuadas DU145 y U-87MG para CXCR2 (figura 1B).

60

- Análisis FACS:

65 Las estirpes celulares de cáncer MDA-MB-231, PC3 y U937 se permeabilizaron y después se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 [44717 (R & D Systems) frente a su referencia de isotipo IgG2b

(SIGMA)] o 10 µ/ml de anticuerpos monoclonales anti-CXCR2 (anti h-CXCR2, clon 48311, R & D Systems, Mab 331 en comparación con su isotipo de referencia IgG2a). Las células se lavaron a continuación con 1% de BSA/PBS/0,01% de NaN₃. A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. Las células se volvieron a lavar dos veces más. Tras el segundo lavado, se realizó el análisis FACS. Los resultados de estos estudios de fijación a receptores se proporcionan en la figura 2. Por lo tanto, las células tumorales tales como MDA-MB-231, PC3 y U937 expresaban tanto las proteínas CXCR4 como CXCR2.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales (Mab) en comparación con CXCR4 humana

Para generar anticuerpos monoclonales contra CXCR4, se inmunizaron ratones Balb/c con células NIH3T3-CXCR4 recombinantes y/o péptidos correspondientes a CXCR4 extracelular N-terminales y bucles. Se inmunizaron una vez ratones de 6-16 semanas de la primera inmunización, con antígeno en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea (sc), seguido de 2 a 6 inmunizaciones con antígeno en adyuvante incompleto de Freund sc. La respuesta inmunitaria se controló por extracciones de sangre retro-orbitales. El suero se identificó por ELISA (como se describe a continuación) y los ratones con los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se utilizaron para fusiones. Los ratones se revacunaron por vía intravenosa con antígeno dos días antes de sacrificio y la extirpación del bazo.

- ELISA

Para seleccionar los ratones productores de anticuerpos anti-CXCR4, se analizaron por ELISA sueros de ratones inmunizados. En resumen, las placas de microvaloración se recubrieron con péptido N-terminal purificado [1-41] conjugado a BSA en 5 µg de péptido equivalente/ml, 100 µl/pocillo se incubaron a 4°C durante la noche, a continuación se bloquearon con 250 µl/pocillo de 0,5% de gelatina en PBS. Se añadieron a cada pocillo diluciones de plasma de ratones inmunizados con CXCR4 y se incubaron 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron con PB S y después se incubaron con un anticuerpo de IgG anti-ratón en cabra de anticuerpos conjugado con HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se revelaron con sustrato TMB, se detuvo la reacción 5 minutos después mediante la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M. Los ratones que desarrollaron los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se utilizaron para la generación de anticuerpos.

- Generación de hibridomas productores de Mab contra CXCR4

Los esplenocitos de ratón, aislados de un ratón BALB/c que desarrollaron los valores más altos de anticuerpos anti-CXCR4 se fusionan con PEG a una estirpe celular SP2/O de mieloma de ratón. Las células se colocaron en placas a razón de aproximadamente 1 x 10⁵/pocillo en placas de microvaloración seguido de dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene medio de cultivo ultra + L-glutamina 2 mM + piruvato sódico 1 mM + 1 x HAT. Los anticuerpos IgG monoclonales anti-CXCR4 en los pocillos se identificaron a continuación por ELISA. Los hibridomas que segregan anticuerpos se subclonaron a continuación, por lo menos dos veces limitando la dilución, se cultivaron *in vitro* para generar anticuerpos para su posterior análisis.

Ejemplo 3: Caracterización por análisis FACS de la especificidad de fijación de Mab 515H7 anti-CXCR4 y reconocimiento de estirpes celulares de cáncer

En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humana de Mab 515H7 anti-CXCR4.

Unas células transfectadas NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4, estirpes celulares de cáncer MDA-MB-231, Hela y U937 se incubaron con 10 mg/ml de anticuerpo monoclonal 515H7. Las células se lavaron después con 1% de BSA/PBS/0,01% de NaN₃. A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. Las células después se volvieron a lavar dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó un análisis FACS. Los resultados de estos estudios de fijación a receptores se proporcionan en la siguiente Tabla 6, que demuestra [intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por FACS] que el Mab 515H7 anti-CXCR4 se une específicamente a la estirpe celular transfectada CXCR4-NIH3T3 humana mientras que no hubo reconocimiento en las células NIH3T3 originales. Este Mab también fue capaz de reconocer estirpes celulares humanas de cáncer, por ejemplo las células de cáncer de mama MDA-MB-231, las células U937 de cáncer promielocítico y células HeLa de cáncer de cuello uterino.

Mab 515H7 anti-CXCR4reconoció NIH3T3-hCXCR4 transfectante mientras que no hubo reconocimiento de las células naturales NIH3T3 originales. Mab 515H7 también fue capaz de reconocer estirpes celulares de cáncer.

Tabla 6

Clon (10 µg/ml)	MFI en estirpes celulares				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	Hela	U937
515H7	16	2752	239	1851	645

Ejemplo 4: Competencia de la fijación Mab 515H7 anti-CXCR4 para [¹²⁵I]SDF-1 en membranas CHO-K1 que expresan de forma estable receptores CXCR4 humanos

5 Este ensayo permite determinar la capacidad de Mab 515H7 para competir por la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado al receptor CXCR4 humano, en lugares de fijación ortoestéricos o alostéricos.

Las células CHO-K1, que expresan de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano se obtuvieron en la transfección de células CHO-K1 indiferenciadas (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero que lleva la secuencia de codificación completa del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Las células se propagaron en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham enriquecido con suero de ternera fetal al 5% (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Los experimentos de fijación de radioligandos se llevaron a cabo en las membranas celulares obtenidas tras el fragmentado mecánico de las células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM], seguido de centrifugación (10.000 g, 15 min). La fijación de [¹²⁵I] SDF-1 (actividad específica: 1.500 Ci/mmol) se realizó utilizando tecnología SPA (análisis de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (30 µg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 o Mab), radioligando (1 nM) y por último perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). El equilibrio de fijación se alcanzó después de 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se estimó la fijación no específica en presencia de 10 µM de SDF-1 no marcado.

La fijación de [¹²⁵I]SDF-1 inhibió en función de la dosis SDF-1 no marcado con un valor de pKi (CI₅₀ = concentración de ligando que produce una inhibición del 50% de fijación específica de [¹²⁵I]SDF-1) de 7,75 ± 0,27 nM (n = 4) (figura 3A). En las mismas condiciones experimentales, 515H7 (100 nM) compitió de manera eficiente por la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 (% de inhibición de [¹²⁵I]SDF-1): (64 ± 3%) (figura 3B).

Ejemplo 5: Modulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS a membranas celulares que expresan el receptor CXCR4 natural por el Mab 515H7 anti-CXCR4

30 Este análisis funcional permite controlar la activación de la proteína G mediante el receptor CXCR4 humano natural y su modulación por ligandos CXCR4 y Mab 515H7.

Se obtuvieron células NIH-3T3 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural como se describe en el ejemplo anterior para las células CHO-K1. Se propagaron células HeLa (carcinoma de cuello uterino humano) en medio de cultivo completo [EMEM enriquecido con 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 2 µ de bicarbonato de sodio]. La fijación de [³⁵S]GTPγS se realizó en membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10.000 g, 15 min). La incorporación y detección de [³⁵S]GTPγS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) se realizó utilizando tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 µg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, GDP 3 µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 o Mab de interés), [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 nM) y, por último, perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). La reacción de fijación se llevó a cabo durante 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). La potencia de antagonistas se calcula aplicando la ecuación de Cheng Prusoff:

$$45 \quad K_B = [\text{conc. antago.}] / \{ (CE_{50}/CE_{50}') - 1 \} \text{ donde } CE_{50} \text{ y } CE_{50}'$$

son, respectivamente, la potencia de SDF-1 en ausencia y en presencia de Mab.

50 SDF-1 produjo un aumento en función de la dosis de la fijación de [³⁵S]GTPγS, como resultado de la activación de la proteína G por el receptor CXCR4. La estimulación máxima de la fijación de [³⁵S]GTPγS representa respectivamente un 167% y 320% respecto a la fijación de [³⁵S]GTPγS de referencia para las membranas celulares HeLa y NIH3T3/CXCR4. La potencia de SDF-1 fue similar para ambas estirpes celulares y correspondió a 41,3 ± 9,7 nM (figura 4). En estas condiciones experimentales, la potencia antagonista de Mab 515H7, determinada en células NIH3T3/CXCR4 era 15 nM. Se observó eficacia antagonista similar para las células HeLa (figura 5).

Ejemplo 6: Asociación de CXCR4 con diferentes parejas de interacción: homodimerización y heterodimerización, recuperación de β-arrestina por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y efecto de Mab 515H7 en estos dímeros

60 Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración producidos tras la fijación de SDF-1 y/o Mab 515H7 al receptor CXCR4 al nivel de la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4, así como la recuperación de la proteína de señalización β-arrestina-2.

65 Para cada una de las parejas de interacción investigadas se construyeron vectores de expresión como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP)

aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4/Rluc + CXCR2:YFP] para estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4/Rluc + β -arr2:YFP] para estudiar la recuperación con CXCR4 como mediador de β -arrestina-2. Al día siguiente, las células se distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas anteriormente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con FBS al 10%]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% a fin de permitir la fijación de las células a la placa. Las células murieron a continuación por inanición con 200 μ l de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se retiró DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 10 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 300 nM en un volumen final de 50 μ l. Después de la incubación durante 10 minutos más a 37°C, se inicia la absorción de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector Multilabel Mithras LB940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para las células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en la ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación BRET multiplicada por 1000.

SDF1 (300 nM) aumentó aproximadamente un 20% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas adaptadoras y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros preexistentes (figura 6 A). Curiosamente, SDF1 (300 nM) disminuyó aproximadamente el 24% de la señal BRET que resulta de la proximidad espacial de las proteínas adaptadoras y aceptadoras fusionados a CXCR2 y CXCR4, lo que indica probablemente también la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros preexistentes (figura 6B). En este último caso, configuración activada por SDF-1 de CXCR4/CXCR2 parece menos favorable para la transferencia de energía BRET. En ambos casos, Mab 515H7 era capaz de modular los cambios de configuración provocados por SDF-1 para homodímeros CXCR4 (69% de inhibición de aumento BRET provocado por SDF-1, figura 6A), así como para la formación de heterodímero CXCR2/CXCR4 (90% de inhibición de la disminución BRET provocada por SDF-1 para 515H7, figura 6B). Mab 515H7 también fue capaz de modular por sí mismo proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4, respectivamente, lo que indica una influencia de Mab 515H7 tanto sobre la configuración del homodímero CXCR4/CXCR4 como del heterodímero CXCR2/CXCR4 (figuras 6A y 6B).

La activación de CXCR4 por SDF-1 (300 nM) produjo una fuerte recuperación de la molécula β -arrestina de señalización intracelular, como se muestra por el aumento del 233% en la señal de BRET (figura 6C). Esta recuperación fue parcialmente inhibida por Mab 515H7 (aproximadamente 95%, figura 6C) que muestra el efecto de Mab 515H7 en la señalización.

Ejemplo 7: Inhibición de la producción de AMPc con CXCR4 como mediador

Este análisis funcional fue diseñado para controlar la señalización del receptor CXCR4 en las adenilato ciclasas por proteínas inhibitoras Gi/o.

El procedimiento LANCE de AMPc (Perkin Elmer) se aplicó como detalla el proveedor. En resumen, se obtuvieron células NIH3T3 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural y se propagaron tal como se ha descrito anteriormente. Las células se recogieron utilizando el agente exento de tripsina de Versene y se volvieron a poner en suspensión a una concentración de 10⁶ células/ml en una solución que contenía el Mab contra AMPc fijado a AlexaFluor (dilución 1/100) y compuesto (forskolina, SDF-1 y/o Mab 515H7). Tras la incubación durante 30 min. a temperatura ambiente, se añadió la mezcla de detección que contenía los complejos europio-estreptavidina (dilución 1/125) y biotina-AMPc (dilución 1/125). Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se midió la señal de FRET resultante en un lector multitargeta Mithras LB940 (Berthold). Los datos se expresan como valores fluorescentes arbitrarios o como una estimulación relativa frente a la respuesta de SDF-1 tras la sustracción del efecto FK.

Producción de AMPc estimulada en función de la dosis de forskolina (FK) con una potencia de aproximadamente 0,3 μ M en células NIH3T3/CXCR4 (figura 7A). En presencia conjunta de SDF-1, las cantidades de AMPc intracelulares disminuyeron como resultado de la activación de la proteína Gi/o inhibitora por el receptor CXCR4. La potencia de SDF-1 fue de 5,0 \pm 3,1 nM (figura 7A). Mab 515H7 inhibió eficazmente el efecto de SDF-1 estimulado por forskolina (100 nM) en más del 80% (figura 7B).

Ejemplo 8: Modulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS a membranas celulares que expresan el receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 mutante constitutiva activo mediante Mab 515H7

Este análisis funcional permite controlar la activación de la proteína G mediante un receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 mutante constitutiva activo (CAM) (véase Zhang *et al.*, 2002). Este análisis sensible permite discriminar ligandos CXCR4 en base a su actividad intrínseca (agonista parcial, antagonista imperceptible o agonista inverso). Como ha descrito anteriormente Zhang y colegas, los ligandos de CXCR4 tales como AMD3100 o T140 se comportaron respectivamente como agonistas parciales y agonistas inversos en el receptor CAM CXCR4. La identificación de antagonistas imperceptibles puede ser difícil, ya que esta clase de molécula debe presentar afinidades similares tanto para estados activos como inactivos de CXCR4 (Wurch *et al.*, 1999).

La introducción de una mutación ASN119Ser en la secuencia de codificación del receptor CXCR4 se realizó mediante la aplicación de técnicas convencionales de biología molecular (kit de mutagenia dirigida de QuickChange, Stratagene EE.UU.). Las células CHO-K1 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CAM CXCR4 se obtuvieron como se describe en el ejemplo anterior. La fijación de [³⁵S]GTPγS se realizó en las membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10.000 g, 15 min). La incorporación de [³⁵S]GTPγS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) se realizó utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 mg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, GDP 3μM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 o Mab), [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 nM) y por último perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). La reacción de fijación se llevó a cabo durante 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer).

La fijación de [³⁵S]GTPγS estimuló SDF-1 (100 nM) el 130%. El agonista T140 inverso inhibió tanto la fijación basal de [³⁵S]GTPγS (- 17%) como la estimulada por SDF-1 (- 159%). Por el contrario, los Mab 515H7 se comportaron como antagonistas imperceptibles en CAM CXCR4, sin alterar la fijación basal [³⁵S]GTPγS (figura 8), pero inhibiendo la fijación de [³⁵S]GTPγS provocada por SDF-1 (figura 8).

Ejemplo 9: Efecto del Mab 515H7 anti-CXCR4 sobre la migración de células U937 provocada por SDF-1

Para determinar el efecto de la inhibición del anticuerpo monoclonal 515H7 anti-CXCR4 en el proceso de migración, se sembraron 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 enriquecido con FCS al 2%, en la cámara superior de las cámaras de migración (placas de 24 pocillos con 8 μm de tamaño de poro) en presencia o en ausencia de SDF-1 en la parte inferior de los pocillos y con o sin Mab 515H7 en la cámara superior. En esta prueba se introdujo IgG2b murina como isotipo de referencia. Dos horas después de la siembra, se hizo el recuento de las células que migran. Los resultados presentados en la figura 9 demostraron que, como era de esperar SDF-1 fue capaz de provocar un aumento significativo de la migración de células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células se incubaron con el isotipo de referencia IgG2b. Por el contrario, para las células incubadas con el Mab 515H7, se observó una disminución significativa y reproducible en la migración de células U937 provocada por SDF-1: más de 80%.

Ejemplo 10: Inhibición por Mab 515H7 anti-CXCR4 del crecimiento tumoral del xenoinjerto MDA-MB-231 en ratones Nod/Scid

El objetivo de estos experimentos fue determinar la capacidad de Mab 515H7 anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento del xenoinjerto MDA-MB-231 en ratones Nod/Scid.

Se cultivaron rutinariamente células MDA-MB-231 de ECACC en medio DMEM (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), FCS al 10% (Sigma, St. Louis MD, EE.UU.). Las células se dividieron 48 horas antes del injerto de manera que estaban en fase exponencial de crecimiento. Diez millones de células MDA-MB-231 se injertaron en PBS a ratones NOD/Scid de 7 semanas (Charles River, Francia). Cinco días después de la implantación, los tumores se podían medir ($34 \text{ mm}^3 < V^3 < 40 \text{ mm}^3$) y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con el tamaño del tumor comparable. Los ratones se trataron por vía ip. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de Mab 515H7.

A continuación, se inyectó a los ratones dos veces a la semana 0,5 mg/dosis/ratón de Mab 515H7 tres veces a la semana. Un grupo de PBS se introdujo como un grupo de referencia en este experimento. El volumen del tumor se midió dos veces por semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. El análisis estadístico se realizó a cada medida utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En estos experimentos, no se observó ningún caso de mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo de PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento del tumor entre D7 y D39 ($p \leq 0,002$) para 515H7 0,5 mg/dosis y el volumen medio del tumor después de 5 semanas de tratamiento se redujo en un 50% frente a PBS para Mab 515H7 (figura 10).

Ejemplo 11: Movilización con el receptor CXCR4 como mediador de las reservas de calcio intracelular

Este análisis funcional fue diseñado para controlar la señalización del receptor CXCR4, mediante la estimulación de la ruta de la fosfolipasa C, provocando la liberación de calcio desde las reservas intracelulares del retículo endoplásmico.

Las células CHO-K1 que expresan de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural se obtuvieron como se describe en el ejemplo anterior. Las células MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) y U937 (leucemia humana) se propagaron en medio de cultivo completo, respectivamente [DMEM enriquecido con 10% de FCS] y [RPMI 1640 enriquecido con 10% de FCS, HEPES 20 mM, 1% de solución de aminoácidos esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de L-glutamina, 4,5 g/l de glucosa]. Todos los tipos de células se sembraron en placas 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado. Las células murieron de inanición durante la noche antes de realizar los experimentos. Las células se cargaron con el colorante fluorescente de calcio (Fluo-4 No Wash, Invitrogen EE.UU.) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, Probenecid ácido 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 se realizó mediante inyección directa en cada pocillo. Para los experimentos de antagonismo, se añadieron directamente 10 µl de solución de Mab en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se realizaron mediciones de la cinética de la fluorescencia en un lector multimodo de microplacas de fluorescencia Mithras LB940 (Berthold) utilizando la siguiente configuración: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada pocillo durante 0,1 segundos cada segundo y durante un período de 20 seg antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación se inyectaron 20 µl de SDF-1 y se registraron los datos seguido de un período de 2 min. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Los valores para cada pocillo se corrigieron en primer lugar restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo de referencia sin células. Los datos relativos se expresaron como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) provocó una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, mientras que no se detectó ninguna señal de fluorescencia en células CHO-K1 indiferenciadas. La intensidad máxima alcanzó > 160% más de fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 30 seg. tras la estimulación por SDF-1; se observaron curvas cinéticas similares tanto con MDA-MB-231 como con U-937 (figuras 11 A, 11B, 11C), aunque la intensidad de fluorescencia máxima por SDF-1 (100 nM) fue menor (130 -140% sobre el basal). El anticuerpo 515H7 (133 nM) produjo una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio provocada por SDF-1 (100 nM) en las tres estirpes celulares investigadas.

Ejemplo 12: Actividad de Mab 515H7 anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones U937

Se cultivaron células U937 de ATCC en medio RPMI 1640, 10% de FCS, 1% de L-glutamina. Las células se dividieron dos días antes de injerto de manera que estaban en la fase exponencial de crecimiento. Se inyectaron por vía ip diez millones de células U937 a ratones Nod/Scid hembra. Dos días después de la implantación, los ratones se trataron por vía sc con una dosis de carga de 2 mg de Mab 515H7/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones de referencia recibieron inyecciones de PBS ya que se ha demostrado en estudios anteriores que no se observó ninguna diferencia en la supervivencia entre los ratones inyectados con PBS y los ratones a los que se administró un isotipo de referencia IgG de ratón. Se hizo seguimiento todos los días de la supervivencia de los ratones.

Los resultados descritos en la figura 12 demostraron que los ratones tratados con Mab 515H7 tenían un aumento drástico y significativo de la vida con T/C% apr 280 para Mab 515H7 (figura 12).

Ejemplo 13: Inhibición por Mab 515H7 anti-CXCR4 del crecimiento de tumores de xenoinjertos con linfocitos T KARPAS 299 en ratones NOD/Scid

El objetivo de este experimento fue determinar la capacidad de Mab 515H7 anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento de xenoinjerto con KARPAS 299 en ratones Nod/Scid.

Se cultivaron de forma rutinaria células KARPAS 299 de ECACC en medio RPMI, 1% de L-Glu y 10% de FCS (Sigma, St. Louis MD, EE.UU.). Las células se dividieron 48 horas antes de injerto para que estuvieran en fase exponencial de crecimiento. Cinco millones de células Karpas 299 se inyectaron en PBS en ratones Nod/Scid (Charles River, Francia) de 7 semanas. Cinco días después de la implantación, se podían medir los tumores ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaños de tumor comparables. Se trataron los ratones por vía ip con una dosis de carga de 2 mg/ratón de Mab 515H7.

A continuación, se inyectó a los ratones dos veces por semana a razón de 1 mg/dosis/ratón de Mab 515H7. Un grupo de PBS se introdujo como grupo de referencia en este experimento. El volumen del tumor se midió dos veces por semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. El análisis estadístico se realizó en cada medición utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En estos experimentos, no se observó ningún caso de mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo de PBS, había una inhibición significativa del crecimiento del tumor entre D7 y D33 ($p \leq 0,002$) para 1 mg/dosis de Mab 515H7 y el volumen medio del tumor después de 5 semanas de tratamiento se redujo en un 63% para Mab 515H7 con relación a PBS (figura 13).

Ejemplo 14: Producción de anticuerpos Mab c515H7 híbridos anti-CXCR4

Se diseñaron formas híbridas de Mab 515H7 murino: corresponde a los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo murino de interés, fusionados genéticamente a dominios constantes humanos Ckappa e IgG1. Se produjo Mab recombinante después de la transfección temporal utilizando el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, EE.UU.).

Las secuencias nucleotídicas completas correspondientes a los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de Mab 515H7 se sintetizaron por síntesis génica global (Genecust, Luxemburgo). Éstas se subclonaron en un vector pCEP4 (InVitrogen, EE.UU.) que lleva la secuencia de codificación completa del dominio constante de la cadena ligera [Ckappa] o de la cadena pesada [CH1-bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1 humana. Todas las etapas de clonación se llevaron a cabo según técnicas de biología molecular convencionales como se describe en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001) o según las instrucciones del proveedor. Cada montaje genético se validó totalmente por secuenciación de nucleótidos utilizando el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EE.UU.) y se analizó utilizando un analizador genético 3100 (Applied Biosystems, EE.UU.).

Se cultivaron rutinariamente células HEK293 EBNA adaptadas a suspensión (InVitrogen, EE.UU.) en matraces de 250 ml en 50 ml de medio exento de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) enriquecido con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación 110 rpm). La transfección temporal se realizó con $2,10^6$ células/ml utilizando polietilenimina (PEI) lineal de 25 kDa (Polysciences) preparada en agua a una concentración final de 1 mg/ml mezclada y ADN plásmido (concentración final de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ para la relación de plásmido de cadena pesada a ligera de 1:1). 4 horas después de la transfección, el cultivo se diluyó con un volumen de medio de cultivo reciente para alcanzar una densidad celular final de 10^6 células/ml. El proceso de cultivo se controló sobre la base de la viabilidad celular y la producción de MAB. Por lo general, los cultivos se mantuvieron durante 4 a 5 días. Mab se purificó utilizando un método de cromatografía convencional sobre una resina de Proteína A (GE Healthcare, EE.UU.). Mab se produjo en concentraciones adecuadas con determinaciones funcionales. Las concentraciones productivas oscilan por lo general entre 6 y 15 mg/l de Mab purificado.

Ejemplo 15: Caracterización por análisis FACS de especificidad de fijación de Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4 y reconocimiento de la estirpe celular de cáncer

En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humana de Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4.

Las células NIH3T3, NIH3T3 transfectadas con hCXCR4 y la estirpe celular de cáncer MDA-MB-231 se incubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal c515H7. Las células se lavaron después con 1% de BSA/PBS/0,01% de NaN_3 . A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. A continuación las células se lavaron de nuevo dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó un análisis FACS. Los resultados de estos estudios de fijación se proporcionan en la siguiente Tabla 7 que demuestra [intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por FACS] que el Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4 se fija específicamente a la estirpe celular NIH3T3 transfectada con CXCR4 humana y también reconocen estirpes celulares de cáncer humano, por ejemplo las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Tabla 7

Mab (10 $\mu\text{g/ml}$)	MFI en estirpes celulares	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c515H7	2294	118

Ejemplo 16: Competencia por la fijación de Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y Mab c515H7 híbrido para [^{125}I]SDF-1 en membranas CHO-K1 que expresan de manera estable el receptor CXCR4 humano

Este ensayo permite determinar la capacidad de Mab m515H7 murino y Mab m515H7 híbrido para competir por la fijación de [^{125}I]SDF-1 radiomarcado al receptor CXCR4 humano, en lugares de fijación ortoestéricos o alostéricos.

Las células CHO-K1, que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano se obtuvieron después de la transfección de células CHO-K1 indiferenciadas (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero que lleva toda la secuencia de codificación del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Las células se propagaron en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham enriquecido con suero de ternera fetal al 5% (FCS) y 500 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina]. Los experimentos de fijación de radioligandos se llevaron a cabo en

membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica de las células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM], seguido de centrifugación (10.000g, 15 min). La fijación de [¹²⁵I]SDF-1 (actividad específica: 1.500 Ci/mmol) se realizó utilizando tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (30 µg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, pH 7,4, de CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 o Mab), radioligando (1 nM) y por último perlas SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). El equilibrio de fijación se alcanza después de 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos con un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). La fijación no específica (NS) se estimó en presencia de 10 µM de SDF-1 no marcado.

Los Mab anti-CXCR4 (100 nM) compitieron de manera eficiente por la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 con el siguiente orden de eficacia competitiva (% de inhibición de [¹²⁵I]SDF-1): m515H7 (62 ± 10%) y c515H7 (55 ± 4%) (figura 14).

Ejemplo 17: Modulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS a membranas celulares que expresan el receptor CXCR4 natural por el Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y el Mab c515H7 híbrido

Este análisis funcional permite controlar la activación de la proteína G por el receptor CXCR4 humana natural y su modulación por Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y Mab c515H7 híbrido.

Se obtuvieron células NIH-3T3 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural como se describe en el ejemplo anterior para las células CHO-K1. Células HeLa (carcinoma de cuello uterino humano) se propagaron en medio de cultivo completo [EMEM enriquecido con 10% de FCS, 1% de L-glutamina, bicarbonato de sodio 2 µM]. La fijación de [³⁵S]GTPγS se realizó en las membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y una centrifugación adicional (10.000 g, 15 min). La incorporación y detección de [³⁵S]GTPγS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) se realizó utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 µg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, GDP 3µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 y Mab de interés), [³⁵S]GTPγS (0,2 a 0,4 nM) y por último perlas SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). La reacción de fijación se llevó a cabo durante 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos con un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calcularon las CI₅₀ para cada Mab.

En estas condiciones experimentales, las CI₅₀ de los Mab m515H7 y c515H7, determinadas en células NIH3T3/CXCR4 fueron 1,9 nM y 1,5 nM, respectivamente (figura 15). Las CI₅₀ de los Mab m515H7 y c515H7 determinadas utilizando células HeLa en las mismas condiciones experimentales fueron 0,2 nM y 0,6 nM, respectivamente (figura 16).

Ejemplo 18: Asociación de CXCR4 con diferentes parejas de interacción: homodimerización y heterodimerización, recuperación de β-arrestina por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y efecto de Mab m515H7 murino y Mab c515H7 híbrido en estos dímeros

Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración provocados en SDF-1 y/o Mab m515H7 murino y Mab c515H7 híbrido que se fijan al receptor CXCR4 en el aspecto de la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4, así como de la recuperación de la proteína β-arrestina-2 de señalización.

Se construyeron vectores de expresión para cada una de las parejas de interacción investigadas como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4-Rluc + CXCR2-YFP] para estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4 Rluc + β-arr2-YFP] para estudiar la recuperación de β-arrestina-2 con CXCR4 como mediador. Al día siguiente, las células se distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas previamente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con 10% de FBS]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% a fin de permitir la fijación de células a la placa. Las células murieron entonces de inanición con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se eliminó DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 15 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante 5 minutos a 37°C y una incubación adicional durante 20 minutos a temperatura ambiente sólo para homo- y heterodímeros, se inició la absorción de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector multitargeta de Mithras LB940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetida 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): [(Emisión_{530 nm}) - (emisión_{485 nm}) × Cf] / (emisión_{485 nm}), donde Cf = (emisión_{530 nm}) / (emisión_{485 nm}) para las células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están

presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en la ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (MBU); MBU corresponde a la relación BRET multiplicada por 1000.

5 SDF1 (100 nM) aumentó en aproximadamente un 10% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros de preexistentes (figura 17A). Curiosamente, SDF1 (100 nM) disminuyó en aproximadamente 17% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas a CXCR4 y CXCR2, lo que probablemente indica también la formación de los heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros preexistente (figura 17B). En este último caso, la configuración activada por SDF-1 de CXCR4/CXCR2 parece menos favorable para la transferencia de energía BRET. En ambos casos, los Mab m515H7 y c515H7 eran capaces de modular los cambios de configuración inducidos por SDF-1 para los homodímeros de CXCR4 (96% de aumento de BRET inducido por SDF-1 para c515H7, figura 17A), así como para la formación de heterodímero CXCR2/CXCR4 (98% de la disminución de BRET inducida por SDF-1 para c515H7, figura 17B). Los Mab m515H7 y c515H7 también eran capaces de modular por sí mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de estos Mab tanto en la configuración del homodímero CXCR4/CXCR4 como del heterodímero CXCR2/CXCR4 (figuras 17A y 17B).

20 La activación de CXCR4 por SDF-1 (100 nM) produjo una fuerte recuperación de la molécula de señalización intracelular β -arrestina, como se muestra por el aumento del 400% en la señal de BRET (Figura 17C). Esta recuperación fue inhibida parcialmente por Mab c515H7 (alrededor de 93%, figura 17C) que muestra el efecto de estos Mab en la señalización.

25 **Ejemplo 19: Movilización con el receptor CXCR4 como mediador de reservas intracelulares de calcio**

Este análisis funcional se diseñó para controlar la señalización del receptor CXCR4, mediante la estimulación de la ruta de la fosfolipasa C, induciendo la liberación de calcio desde las reservas intracelulares del retículo endoplásmico.

30 Las células CHO-K1 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural se obtuvieron como se describe en el ejemplo anterior. Las células U937 (leucemia humana) se propagaron en medio de cultivo completo, respectivamente [DMEM enriquecido con 10% de FCS] y [medio RPMI 1640 enriquecido con 10% de FCS, HEPES 20 mM, 1% de solución de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de L-glutamina, 4,5 g/l de glucosa]. Todos los tipos de células se sembraron en placas 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado. Las células se murieron de inanición durante la noche antes de realizar los experimentos. Las células se cargaron con el colorante fluorescente de calcio (Fluo-4 No Wash, Invitrogen EE.UU.) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, Probenecid ácido 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 se realizó por inyección directa en cada pocillo. Para los experimentos de antagonismo, 10 μ l de solución de Mab se añadieron directamente en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se realizaron mediciones de la cinética de la fluorescencia en un lector multimodo de microplacas de fluorescencia Mithras LB940 (Berthold) utilizando la siguiente configuración: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. La fluorescencia en cada pocillo se registró durante 0,1 segundos cada segundo y durante un período de 20 s antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación se inyectaron 20 μ l de SDF-1 y el registro de datos siguió durante un período de 2 min. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Los valores para cada pocillo se corrigieron en primer lugar restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo de referencia sin células. Los datos relativos se expresaron en porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

50 SDF1 (100 nM) provocó una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, mientras que no se detectó ninguna señal de fluorescencia en las células CHO-K1 indiferenciadas. La intensidad máxima alcanzó > 140% más de fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 40 s. tras la estimulación por SDF-1; se observaron curvas cinéticas similares con células U-937 (figuras 18A, 18B). El anticuerpo híbrido c515H7 (133 nM) produjo una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio provocada por SDF-1 (100 nM) en ambas estirpes celulares investigadas.

Ejemplo 20: Efecto de Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y del Mab C515H7 híbrido sobre la migración de células U937 provocada por SDF-1

60 Para determinar el efecto inhibitorio de los Mab m515H7 y c515H7 anti-CXCR4 en el proceso de migración, se sembraron 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 enriquecido con FCS al 2%, en la cámara superior de las cámaras de migración (placas de 24 pocillos con 8- μ m de tamaño de poro) en presencia o en ausencia de SDF-1 en la parte inferior de los pocillos y con o sin Mab c515H7 y m515H7 en la cámara superior. En esta prueba se introdujo IgG2b murina como isotipo de referencia. Dos horas después de la siembra, se contaron las células migratorias. Los resultados presentados en la figura 19 demostraron que, como se esperaba SDF-1 fue capaz de provocar un aumento significativo de la migración de células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células se

incubaron con el isotipo de referencia IgG2. Por el contrario, para las células incubadas con los Mab c515H7 y m515H7, se observó una disminución significativa y reproducible en la migración de células U937 provocada SDF-1: aproximadamente más del 80% con los Mab c515H7 y m515H7.

5 **Ejemplo 21: Actividad de Mab c515H7 híbrido anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones U937**

Se cultivaron células U937 de ATCC en medio RPMI 1640, 10% de FCS, 1% de L-glutamina. Las células se dividieron dos días antes del injerto de manera que estaban en fase exponencial de crecimiento. Se inyectaron por vía ip diez millones de células U937 a ratones Nod/Scid hembra. Dos días después de la implantación, los ratones se trataron por vía sc con una dosis de carga de 2 mg de Mab c515H7/ratón y a continuación dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones de referencia recibieron inyecciones de PBS ya que se ha demostrado en estudios anteriores que no se observó ninguna diferencia en la supervivencia entre los ratones inyectados con PBS y ratones a los que se administró un isotipo de referencia IgG de ratón. La supervivencia de los ratones se controló cada día.

Los resultados descritos en la figura 20 demostraron que los ratones tratados con el Mab c515H7 presentaban un aumento drástico y significativo de vida con T/C% de aproximadamente 180.

20 **Ejemplo 22: Humanización de anticuerpos 515H7 anti-CXCR4 murinos**

Procedimiento general

La humanización del anticuerpo 515H7 anti-CXCR4 se realizó aplicando de las reglas generales de injerto de CDR. El análisis inmunogenético y la definición de CDR y las regiones marco (FR) se llevaron a cabo aplicando el esquema de numeración única de IMGT, así como las bibliotecas y herramientas de IMGT (Lefranc, 1997 - www.imgt.org).

La eficiencia del proceso de humanización se determinó mediante pruebas de capacidad de actividad funcional de los anticuerpos manipulados para inhibir la recuperación de β -arrestina con SDF-1 como mediador mediante un análisis de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). En este análisis CXCR4 se marcó con luciferasa y β -arrestina con YFP. La recuperación de β -arrestina a CXCR4 con SDF-1 como mediador es un paso importante en la transducción de señal de CXCR4. La fijación de las variantes humanizadas de 515H7 se determinó también en una estirpe celular NIH3T3 transfectada de forma estable con CXCR4 humano. La actividad de fijación se determinó mediante un ensayo competitivo con el anticuerpo de ratón biotilado. En un segundo intento, se determinó la capacidad de los anticuerpos humanizados para inhibir la fijación de SDF-1 biotilado a células de Ramos. Se eligieron las células de Ramos debido a su alta expresión de CXCR4 y baja expresión de CXCR7 y SDF-1.

Estos análisis se utilizaron para caracterizar las versiones humanizadas recombinantes de anticuerpos anti-CXCR4. Los dominios variables se formatearon con dominios constantes IgG1/k humanos y se clonaron en el vector de expresión pCEP de mamíferos. Anticuerpos recombinantes derivados de IgG₁/k se expresaron temporalmente en células HEK293. Los sobrenadantes de cultivo de expresión se filtraron y los anticuerpos se purificaron utilizando proteína A sefarosa. Los anticuerpos purificados se volvieron a tamponar en PBS y las concentraciones de anticuerpos se determinaron por ELISA.

Humanización de dominios variables de 515H7

A fin de seleccionar una estirpe germinativa humana apropiada para el injerto de CDR, se identificó el gen de la estirpe germinativa humana con la mayor homología con la secuencia murina de la VH de 515H7. Con la ayuda de las bases de datos y herramientas de IMGT, se seleccionaron genes de la estirpe germinativa IGHV3 humana y genes de la estirpe germinativa IGHJ4*01 J humana como secuencias de aceptadores humanos para las CDR de la VH de 515H7 murino. El gen V humano IGHV3-49*04 tiene una homología del 80,27% con el gen V del dominio variable de la cadena pesada de 515H7 de ratón. La homología para el IGHJ4 gen J humano*01 J es del 87,50%. Diecinueve restos son diferentes entre los genes seleccionados de la estirpe germinativa humana y el dominio VH del anticuerpo 515H7 de ratón. La alineación entre el dominio VH del anticuerpo original y las secuencias de la estirpe germinativa se representan en la figura 21.

En cuanto el dominio variable de la cadena ligera, se seleccionaron los genes de la estirpe germinativa humana IGKV4-1*01 e IGKJ1*01 (figura 22). La homología con el gen V humano IGKV4-1*01 es del 79,12%. El gen J de 515H7 de la cadena ligera tiene una homología del 84,85% con el gen J humano IGKJ1*01.

La secuencia de aminoácidos de los genes IGHV3-49*04 e IG V4-1*01 de la estirpe germinativa humana traducidos se utilizó para identificar anticuerpos homólogos que se han cristalizado. Para la cadena pesada el anticuerpo con el número de registro 1MAM en el RCSB Protein Data Bank se seleccionó como modelo, mientras que para la cadena ligera se seleccionó el anticuerpo 1SBS. Los dos dominios se ensamblaron utilizando el programa informático DS visual y se utilizó como un modelo para el anticuerpo 515H7 humanizado.

Sobre la base de la posición de cada resto que es diferente entre el anticuerpo original y la secuencia de la estirpe germinativa humana correspondiente, se da un orden de prioridad para cada resto que difiere entre las secuencias humanas y de ratón (figuras 21 y 22). Estas prioridades se utilizaron para crear tres variantes diferentes de cada dominio variable humanizado denominadas VH1, VH2 y VH3, respectivamente.

En una primera serie de experimentos, los inventores construyeron y analizaron las actividades de fijación anti-CXCR4 de las tres primeras variantes humanizadas. La variante 1 de VH (VH1) se combinó con la VL murina y se determinó la capacidad de estos montajes para inhibir la fijación de un anticuerpo original 515H7 murino biotinilado. Todos los montajes presentaban capacidad similar para competir con el anticuerpo murino (figura 23A-C). Esto indica que la variante VH más humana tiene la misma capacidad de fijación que las variantes menos humanas. Por lo tanto, la VH1 se combinó con las tres variantes diferentes de VL (figura 23D-F). Sólo la combinación de VH1 y VL3 presentó una reducción de la capacidad para competir con el anticuerpo murino biotinilado, mientras que la variante más humana VH1 VL1 que lleva retromutaciones en los marcos presentó la misma actividad de bloqueo transversal que el anticuerpo híbrido.

Esta variante VH1 VL1 se ensayó además su capacidad para inhibir la recuperación de β -arrestina con SDF-1 como mediador en análisis BRET (figura 24). A pesar de la actividad de fijación al receptor deseable determinada por bloqueo transversal del anticuerpo original, el montaje VH1 VL1 mostró sólo una débil inhibición de la recuperación de β -arrestina. Esta falta de fuerte actividad inhibitoria hace necesaria la sustitución de restos de marco humano con restos murinos. Se construyeron retromutaciones individuales para la VH1. Se sustituyeron los siguientes restos: V48L, E61D, D76N y A81L (numeración según la secuencia primaria de aminoácidos). Estos retromutantes individuales de la variante VH1 se combinaron con la variante VL1. De éstos, sólo la retromutación D76N volver condujo a un aumento de inhibición de la transducción de señales determinada por análisis BRET (figura 25B).

Para aumentar la actividad de este montaje y valorar aún más la importancia de otros restos se construyeron diferentes retromutantes dobles para la VH 1. La actividad inhibitoria de estos montajes se mejoró ligeramente (inhibición media de aproximadamente 45-50%), pero no es satisfactoria (figura 25C). El retromutante simple D76N se combinó a continuación con las tres variantes VL diferentes (figura 25D). El montaje hz515H7 VH D76N VL2 presentó una actividad de 88,2% de promedio que está en el mismo intervalo que el anticuerpo híbrido.

Se construyeron retromutaciones simples y dobles en el dominio VL1 variable y en comparación con la actividad del montaje hz515H7 VH1 D76N VL2 (figura 26). Ninguna de las combinaciones ensayadas tenía una actividad similar o mejor que este montaje.

Se calculó el porcentaje de restos humanos en el marco para hz515H7 VH1 D76N VL2: contiene 14 restos no humanos de cada 180 restos, lo que equivale a un «índice de germinatividad» del 92,2%. A modo de comparación, los anticuerpos humanizados y comercializados bevacizumab y trastuzumab contienen, respectivamente, 30 y 14 restos no humanos en sus dominios variables.

En las cuatro formas mejor humanizadas, que presentan la eficacia más fuerte para inhibir la recuperación con SDF-1 como mediador se analizó también su capacidad para inhibir la fijación de SDF-1 biotinilado (figura 27 A). Se determinó una correlación estrecha de la inhibición de la fijación de SDF-1 y la recuperación de β -arrestina. Esta correlación indica que la inhibición de la fijación de SDF-1 es más probable que el principal mecanismo de la inhibición de la transducción de señales.

A fin de humanizar más la variante hz515H7 VL1 D76N VH2, se diseñaron tres variantes adicionales, utilizando la información obtenida con los mutantes dobles y triples determinados en la figura 26. Cuatro y cinco restos adicionales se humanizaron en las variantes VL2.1, VL2.2 y VL2.3 respectivamente (también conocidas como VL2-1, VL2-2 y VL2-3). Corresponden a los restos D9, P49, D66, S69, S83, L84; V89. Una alineación de estas tres variantes en comparación con VL2 se muestra la figura 28.

Se determinó la capacidad de estas variantes de VL2 para inhibir la recuperación de β -arrestina con SDF-1 como mediador. Las variantes hz515H7 VH1 D76N VL2, VL2.1, VL2.2 y VL2.3 humanizadas presentaron una actividad similar a la del anticuerpo híbrido c515H7 (figura 26).

Humanización de dominios variables de 515H7-2

Con el fin de generar otra forma humanizada, se seleccionó otra estirpe germinativa humana apropiada para el injerto de CDR, tanto para el dominio variable de las cadenas ligeras como pesadas. Para ambas, se seleccionó la estirpe germinativa, no sólo con respecto al porcentaje de homología con la secuencia murina, sino también en cuanto que tienen la misma longitud de CDR que la VL y VH, respectivamente, de la 515H7 murina.

Con la ayuda de las bases de datos y herramientas de IMGT, el gen de la estirpe germinativa IGHV3-73*01 humana y el gen de la estirpe germinativa IGHJ4*01 J humana se seleccionaron como secuencias de aceptadores humanos para las CDR de VH 515H7 murinas. El gen V humano IGHV3 -73*01 tiene una homología mayor del 79% con el

gen V del dominio variable de la cadena pesada de 515H7 de ratón. La homología para el gen J IGHJ4 humano*01 es del 87,50%.

5 En cuanto el dominio variable de la cadena ligera, se seleccionaron los genes de la estirpe germinativa humana IGKV2D-40*01 e IGKJ1*01. La homología con IGKV2D-40*01 del gen V humano es superior al 70%. El gen J de 515H7 de la cadena ligera tiene una homología del 84,85% con la IGKJ1*01 del gen J humano.

10 Sobre la base de la posición de cada resto que es diferente entre el anticuerpo original y la correspondiente secuencia de la estirpe germinativa humana, y del conocimiento del experto en la materia, se identificaron varios restos críticos como restos retromutados.

En cuanto a la cadena pesada, estos restos son H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y/o A81L (véanse las SEC ID nº 86 y nº 90 de la Tabla 2c).

15 Con respecto a la cadena ligera, estos restos son L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L (véanse las SEC ID nº 85 y nº 89 de la Tabla 2c).

20 **Ejemplo 23: Caracterización por análisis FACS de la especificidad de fijación de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4 y reconocimiento de la estirpe celular de cáncer**

En este experimento, se examinó por análisis FACS la fijación específica a CXCR4 humana de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4.

25 Células NIH3T3, NIH3T3 transfectadas con hCXCR4 y células de Ramos, estirpes celulares U934 de cáncer se incubaron con 0 a 10 µg/ml de Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2 [= hz515H7VL2], hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [= hz515H7VL2.1], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [= hz515H7VL2.2] y hz515H7 VH1 D76N VL2.3 [= hz515H7VL2.3]) durante 20 min a 4°C en la oscuridad en 100 µl de tampón FACS. Después de 3 lavados en tampón FACS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario, un Alexa 488 antihumano en cabra (dilución 1/500), durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de 3 lavados en tampón FACS, se añadió yoduro de propidio en cada pocillo y sólo las células viables se analizaron por FACS. Se cuantificaron por lo menos 5.000 células viables para determinar el valor medio de intensidad de fluorescencia para cada condición.

35 Los resultados de estos estudios de fijación se proporcionan en las figuras 29A-29C que demuestran [intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida por FACS] que los Mab hz515H7 humanizados anti-CXCR4 se unen específicamente a la estirpe celular humana NIH3T3 transfectada con CXCR4 (figura 29 A) (IFM = 2.2 con células madre NIH3T3) y también reconocen estirpes celulares de cáncer humano, por ejemplo U937 (figura 29B) y de Ramos (figura 29C).

40 **Ejemplo 24: Modulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS a las membranas celulares que expresan el receptor CXCR4 natural por los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4**

Este análisis funcional permite controlar la activación de la proteína G por el receptor CXCR4 humano natural y su modulación por los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4.

45 Células NIH-3T3 que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 natural se obtuvieron como se describe en el ejemplo anterior para las células CHO-K1. La fijación a [³⁵S]GTPγS se realizó en membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10.000 g, 15 min). La incorporación y detección de [³⁵S]GTPγS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) se realizó utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 µg/pocillo) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, GDP 3µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 y los anticuerpos monoclonales de interés), [³⁵S]GTPγS (0,2 a 0,4 nM) y por último perlas SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). Reacción de fijación se llevó a cabo durante 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calcularon las CI₅₀ para cada Mab.

55 En estas condiciones experimentales, las CI₅₀ de los Mab 515H7 humanizados (hz), determinados en células NIH3T3/CXCR4 eran 3,86 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 (figura 30A), 4,05 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-1 (figura 30B), 5,19 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-2 (figura 30C) y 8,5 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-3 (figura 30D).

60 Los Mab hz515H7 también pudieron inhibir la fijación de [³⁵S]GTPγS estimulada por SDF-1 (100 nM) con un % de inhibición de 86% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2, 69% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-1, 66% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-2 y 58% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-3 (figura 31).

Ejemplo 25: Asociación de CXCR4 con diferentes parejas de interacción: homo- y hetero-dimerización, recuperación de β -arrestina por un método de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y efecto de los Mab 515H7 humanizados en estos dímeros

5 Este análisis funcional permite determinar los cambios de configuración provocados en SDF-1 y/o los Mab 515H7 humanizados que se fijan al receptor CXCR4 en la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4, así como la recuperación de la proteína de señalización β -arrestina-2.

10 Los vectores de expresión para cada uno de las parejas de interacción investigadas se construyeron como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) mediante la aplicación de técnicas convencionales de biología molecular. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, las células HEK293 se transfectaron temporalmente con vectores de expresión que codifican las correspondientes parejas de BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4-Rluc + CXCR2-YFP] para estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4 Rluc + β -arr2-YFP] para estudiar la recuperación de β -arrestina-2 con CXCR4 como mediador. Al día siguiente, las células se distribuyeron en placas 96 MW blancas recubiertas previamente de polilisina en medio de cultivo completo [DMEM enriquecido con FBS al 10%]. Las células se cultivaron en primer lugar a 37°C con CO₂ al 5% con el fin de permitir la fijación de las células a la placa. Las células murieron entonces de inanición con 200 μ l de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se eliminó DMEM y las células se lavaron rápidamente con PBS. Se incubaron las células a continuación en PBS en presencia o ausencia de anticuerpos, 15 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 μ l. Después de la incubación durante 5 minutos a 37°C y una incubación adicional durante 20 minutos a temperatura ambiente sólo para homo- y hetero-dímeros, se inició la absorción de emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector multitargeta Mitra LB 940 (Berthold) (1s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

25 El cálculo de la relación de BRET se realizó como se ha descrito anteriormente (Angers *et al.*, 2000.): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para las células que expresan la proteína de fusión Rluc solo en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación se demuestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando las dos parejas BRET están presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, sólo cuando la pareja fusionada a Rluc está presente en el ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (MBU); MBU corresponde a la relación BRET multiplicado por 1000.

35 SDF1 (100 nM) aumentó en un 12% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros de preexistentes (figura 32A). Curiosamente, SDF1 (100 nM) disminuyó en aproximadamente 16% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donantes y aceptadoras fusionadas a CXCR4 y CXCR2, lo que probablemente indica también la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios de configuración de dímeros preexistentes (figura 32B). En este último caso, configuración de CXCR4/CXCR2 activada por SDF-1 parece menos favorable para la transferencia de energía de BRET. En ambos casos, los Mab 515H7 humanizados pueden modular los cambios de configuración provocados por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 con un porcentaje de inhibición del aumento de BRET provocado por SDF-1 de aproximadamente 88% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2, 65% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, 33% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.2 y 21% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.3 (figura 32A), así como para el heterodímero CXCR2/CXCR4 con un porcentaje de inhibición de la disminución de BRET provocada por SDF-1 de aproximadamente el 100% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2 y 50% para los Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, hz515H7 VH1D76N-VL2.2 y hz515H7 VH1D76N-VL2.3 (figura 32B). Los Mab 515H7 humanizados también pudieron modular por sí mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4, respectivamente, lo que indica una influencia de estos Mab tanto en la configuración homodímero de CXCR4/CXCR4 como en la de heterodímero CXCR2/CXCR4 (figuras 32A y 32B).

50 La activación de CXCR4 por SDF-1 (100 nM) produjo una fuerte recuperación de la molécula β -arrestina de señalización intracelular, como se demuestra por la mejora de 390% en la señal de BRET (figura 32C). Esta recuperación fue inhibida parcialmente por los Mab 515H7 humanizados aproximadamente 94% de inhibición para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2, 81% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, 82% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.2 y 71% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.3 (figura 32C) que demuestra el efecto de estos Mab en la señalización.

Ejemplo 26: Estudios inmunohistoquímicos (IHC)

60 Las secciones se desparafinaron, se rehidrataron, y se colocaron durante 7 minutos en EDTA precalentado a 98°C pH 8 para la recuperación del epítipo producida por calor. Después de 3 lavados en solución salina con tampón Tris con 0,05% de Tween 20 (TBS-T) (Dako S3006) se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena utilizando reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron con TBS-T y se incubaron en reactivo de bloqueo (bloque UltraV-TA-125UB-Lab Vision) durante 5 minutos antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-CXCR-4 de ratón (50 μ g/ml, clon 515H7, Pierre Fabre) o IgG1 de ratón/kappa (50 μ g/ml, X0931, Dako) como referencia durante la noche a 4°C. Las secciones se lavaron con TBS-T y se incubaron

con Envision Dual Link durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado de un producto de reacción marrón (Dako 3468) se utilizó diaminobencidina. Los portaobjetos se sumergieron en hematoxilina durante 4 minutos para la tinción por contraste (DAKO S3309) y se lavaron en PBS antes de montarse en medio de montaje Faramount más cubreobjetos. En este procedimiento de inmunohistoquímica, el producto de reacción marrón se correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la falta de producto de reacción marrón se correlaciona con la tinción negativa y la falta de visualización de la membrana celular.

El anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 de ratón, clon 515H7, tiñó de manera diferenciada la membrana celular de diversos tipos de tumores. Las figuras 33 y 34 ilustraban la tinción realizada en 2 modelos de xenoinjerto en los que se ha descrito una actividad antitumoral para 515H7: Ramos y KARPAS299. Como se muestra en las figuras 33 y 34, la tinción obtenida depende del fijador. De hecho, la tinción membranosa era más débil cuando los tejidos se fijaban con formalina (figuras 34a y 34c), mientras que, cuando se utilizaba Glyo-fixx (sustituto de formalina), tinción membranosa aumentó de manera significativa (figuras 33a y 33c).

15 **Ejemplo 27: Fijación competitiva de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4 por [¹²⁵I]SDF-1 en membranas de CHO-K1 que expresan de forma estable el receptor CXCR4 humano**

Este ensayo permite determinar la capacidad de los Mab 515H7 humanizados para competir por la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado al receptor CXCR4 humano, en lugares de fijación ortoestéricos o alostéricos.

Se obtuvieron células CHO-K1, que expresan de forma estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano después de la transfección de células CHO-K1 indiferenciadas (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero que lleva toda la secuencia de codificación del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Las células se propagaron en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham enriquecido con 5% de suero de ternera fetal (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Se llevaron a cabo experimentos de fijación de radioligandos en las membranas celulares obtenidas tras la fragmentación mecánica de células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM], seguido de centrifugación (10.000g, 15 min). La fijación de [¹²⁵I]SDF-1 (actividad específica: 1.500 Ci/mmol) se realizó utilizando tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (30 µg/ml) en tampón de fijación [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%], junto con el compuesto a determinar (SDF-1 o Mab), radioligando (1 nM) y por último perlas SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). El equilibrio de fijación se alcanzó después de 1 hora a 25°C. Tras la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron recuentos radiactivos con un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). La fijación no específica (NS) se estimó en presencia de SDF-1 10 µM sin marcar.

Los Mab anti-CXCR4 compieron de manera eficiente por la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 con el siguiente orden de clasificación de eficacia competitiva (% de inhibición de [¹²⁵I]SDF-1): hz515H7 VH1D76N VL2 (77%), hz515H7 VH1D76N VL2.1 (68%), hz515H7 VH1D76N VL2.2 (61%) y hz515H7 VH1D76N VL2.3 (49%) (figura 35A). Los Mab Hz515H7 inhibieron en función de la dosis la fijación de [¹²⁵I]SDF-1 con CI₅₀ de 1,44 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2 (figura 35B), 6,69 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2.1 (figura 35C), 5,91 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2.2 (figura 35D)

45 **Ejemplo 28: Movilización de las reservas de calcio intracelular con el receptor CXCR4 como mediador**

Este análisis funcional se diseñó para controlar la señalización del receptor CXCR4 por estimulación de la ruta de la fosfolipasa C, provocando la liberación de calcio de las reservas intracelulares desde el retículo endoplásmico.

Se propagaron células U937 (leucemia humana) en medio de cultivo completo [medio RPMI 1640 enriquecido con FCS al 10%, HEPES 20 mM, solución de aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina al 1%, 4,5 g/l de glucosa]. Las células se sembraron en placas 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado y murieron de inanición durante la noche antes de realizar los experimentos. Las células se cargaron con el colorante fluorescente de calcio (Fluo-4 No Wash, Invitrogen EE.UU.) en tampón de carga [HBSS1x, HEPES 20 mM, Probenecid ácido 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido de 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 se realizó por inyección directa en cada pocillo. Para los experimentos de antagonismo, se añadió directamente 10 µl de solución de Mab en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se realizaron mediciones de la cinética de la fluorescencia en un lector multimodo de microplacas de fluorescencia Mithras LB940 (Berthold) utilizando la siguiente configuración: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada pocillo durante 0,1 segundos cada segundo y durante un período de 20 seg antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación se inyectaron 20 µl de SDF-1 y se registraron los datos seguido de un período de 2 min. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Los valores para cada pocillo se corrigieron en primer lugar restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo de referencia sin células. Los datos relativos se expresaron en porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) provocó una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en las células U937. La intensidad máxima alcanzó > 340% sobre la fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 40 s. tras la estimulación por SDF-1. Mab hz515H7 VH1D76N VL2 (133 nM) produjo una inhibición parcial de la señal de calcio provocada por

SDF-1 (100 nM) en estirpes de células U937 (figura 36 en la que dicho Mab es recién denominado hz515H7VL2 en la leyenda).

Ejemplo 29: Efecto de Mab hz515H7 humanizado anti-CXCR4 en la migración de células U937 provocada por SDF-1

Para determinar el efecto inhibitor del anticuerpo Mab hz515H7 humanizado VH1D76N VL2 anti-CXCR4 (denominado hz515H7) en el proceso de migración, se incubaron células U937 con 10 µg/ml de anticuerpos durante 40 minutos en medio RPMI1640 que contenía FBS al 2% a 37°C en CO₂ al 5%. Se sembraron un total de 5x10⁴ células en la cámara Transwell superior (Corning Lowell, MA, EE.UU.). En la cámara inferior SDF-1 (100 ng/ml) se añadió en el medio que contenía FBS al 2%. Se midió la migración de las células U937 contando el número de células que migró de cámaras Transwell 2 horas después de la siembra de células en la cámara superior. Las células migradas se contaron utilizando el ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter-Glo[®] midiendo el número de células viables en cultivo basado en la cuantificación del ATP.

Los resultados presentados en la figura 37A demostraron que, como se esperaba SDF-1 fue capaz de provocar un aumento significativo en la migración de células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células se incubaron con el isotipo de referencia IgG1. Por el contrario, la figura 37A muestra la inhibición de la migración de células U937 provocada por SDF1 por 10 µg/ml de Mab hz515H7 VH1 D76N VL2. Los resultados representan la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La figura 37B representa el efecto de un intervalo de dosis de Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 sobre la migración celular provocada por SDF-1. Los resultados representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes (CI₅₀ = 4,53 10³ µg/ml ± 2,2 10⁻³).

Ejemplo 30: Estudios inmunohistoquímicos (IHC) con hz515H7 VH1 D76N VL2

Las secciones se desparafinaron, rehidrataron y se colocaron durante 7 minutos en EDTA precalentado a 98°C pH 8 para la recuperación del epítipo producida por calor. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris y Tween 20 al 0,05% (TBS-T) (Dako S3006), se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena utilizando reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron con TBS-T y se incubaron en reactivo de bloqueo (UltraV bloque-TA-125UB-Lab Vision) durante 5 minutos antes de la incubación con el anticuerpo humanizado anti-CXCR4 biotinilado (50 µg/ml, hz515H7 VH1 D76N VL2, Pierre Fabre) o la IgG1 humana biotinilada (50 µg/ml, BP078, The Binding Site) como isotipo de referencia durante la noche a 4°C. Se lavaron las secciones con TBS-T y se incubaron con estreptavidina HPvP durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó diaminobencidina para el desarrollo de un producto de reacción marrón (Dako K3468). Los portaobjetos se sumergieron en hematoxilina durante 4 minutos para tinción por contraste (DAKO S3309) y se lavaron en PBS antes de montarse en medio de montaje Faramount más cubreobjetos. En este procedimiento de inmunohistoquímica, el producto de reacción marrón se correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la falta de producto de reacción marrón se correlaciona con la tinción negativa y la falta de visualización de la membrana celular.

El anticuerpo 515H7 VH1 D76N VL2 humanizado anti-CXCR4 biotinilado, tiñe de forma diferenciada la membrana celular de diversos tipos de tumores. Las tinciones ilustradas en las figuras 38 y 39 realizadas en 2 modelos de xenoinjerto en los que se describe una actividad antitumoral cuando los ratones se trataron con 515H7: Ramos y KARPAS299. Como se muestra en las figuras 38 y 39, la tinción obtenida es función del fijador. De hecho, la tinción membranosa es más débil cuando los tejidos se fijaron con formalina (figura 39a y 39c), mientras que, cuando se utilizó Glyo-fixx (sustituto de formalina), la tinción membranosa aumentaba significativamente (figura 38a y 38c)

Ejemplo 31: Efecto de los Mab 515H7 híbrido (c515H7), las formas humanizadas hz515H7 VH1D76N VL2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.1 sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto de Ramos en linfocitos B en ratones Scid

Se cultivaron rutinariamente células de Ramos procedentes de la ATCC en medio RPMI 1640, 10% de FCS y L-Glu 2 mM (Sigma, St. Louis MD, EE.UU.). Las células se dividieron 48 horas antes de injerto de manera que estaban en fase exponencial de crecimiento. Diez millones de células de Ramos se injertaron en PBS por vía sc. En ratones SCID hembra de 7 semanas (Charles River, Francia). Cinco días después de la implantación, los tumores se podían medir (100 mm³ de media) y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con el tamaño del tumor comparable. Los ratones se trataron por vía ip con una dosis de carga de 2 mg/ratón de los Mab c515H7, hz515H7 VH1D76N VL2 o hz515H7 VH1 D76N VL2.1. A continuación, se inyectó a los ratones dos veces por semana a razón de 1 mg/dosis/ratón de los Mab c515H7, hz515H7 VH1 D76N VL2 o hz515H7VH1 D76N VL2.1. En este experimento se introdujo un grupo de PBS como grupo de referencia. El volumen del tumor se midió dos veces a la semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. Los análisis estadísticos se realizaron a cada medida utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En estos experimentos, no se observó ningún caso de mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo de PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento del tumor entre D11 y D54 para 1 mg/dosis de Mab

c515H7 (figura 40) Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 (figura 41) y hz515H7 VH1 D76N VL2.1 (figura 42) y el volumen del tumor medio después de 4 semanas de tratamiento se redujo en un 92% para los ratones tratados con los Mab c515H7 y hz515H7 en comparación con el grupo de PBS.

5 **Listado de secuencias**

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Nuevos anticuerpos anti-CXCR4 humanizados para el tratamiento del cáncer

10

<130> D28523

<150> EP 10290167.5

<151> 2010-03-30

15

<160> 96

<170> PatentIn versión 3.3

20

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> homo sapiens

25

<400> 1

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

ES 2 469 369 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 2

Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr
 1 5 10 15

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

Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile
 35 40 45

10

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile

ES 2 469 369 T3

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

ES 2 469 369 T3

<210> 3
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<400> 3

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
 20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
 50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
 65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
 85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
 100 105 110

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
 115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
 130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
 145 150 155 160

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
 165 170 175

ES 2 469 369 T3

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
 180 185 190

Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 195 200 205

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
 210 215 220

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
 225 230 235 240

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
 245 250 255

Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
 260 265 270

Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
 275 280 285

Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
 290 295 300

Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
 305 310 315 320

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
 325 330 335

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
 340 345 350

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
 355 360

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 5
 Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 6
Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 7
Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

10 <210> 8
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus

15 <400> 8
Trp Ala Ser
1

20 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus

25 <400> 9
Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
1 5

30 <210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> variante humanizada de VH

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> variante humanizada de VH

 10 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

 15 <210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> variante humanizada de VH

 <400> 12

ES 2 469 369 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 120
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> variante humanizada de VH

<400> 13
Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 14

<211> 112
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 15
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

20

ES 2 469 369 T3

<210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 16

```

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
                20           25           30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
            50           55           60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
10           85           90           95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100          105          110
    
```

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> variante humanizada de VL

20

<400> 17

```

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
                20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
            50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100          105          110
    
```

ES 2 469 369 T3

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> variante humanizada de VL

 10 <400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 15 <210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> variante humanizada de VL

 <400> 19

ES 2 469 369 T3

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 112
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

10 <400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 21
<211> 450
<212> PRT
<213> artificial

<220>
20 <223> variante humanizada de VH

ES 2 469 369 T3

<400> 21

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

ES 2 469 369 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

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

ES 2 469 369 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 22
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

10

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ES 2 469 369 T3

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

ES 2 469 369 T3

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 23
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

10

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

ES 2 469 369 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

ES 2 469 369 T3

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

5 <210> 24
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 24
 Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

ES 2 469 369 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

ES 2 469 369 T3

<210> 25
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 25

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

10

<210> 26
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> variante humanizada de VL

20

<400> 26

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

5

<210> 27
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 27

ES 2 469 369 T3

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

5 <210> 28
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 28

ES 2 469 369 T3

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 29
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 29

ES 2 469 369 T3

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

5 <210> 30
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 30

ES 2 469 369 T3

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 31
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 31

ES 2 469 369 T3

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

- 5 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
- 10 <220>
 <223> CDR humanizada optimizada

 <400> 32
 ggcttcacct tcaccgacaa ctac 24
- 15 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> CDR humanizada optimizada
 5 <400> 33
 atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 30
 <210> 34
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> CDR humanizada optimizada
 15 <400> 34
 gccagggacg tggcgagcaa ctactcgac tac 33
 <210> 35
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> CDR humanizada optimizada
 <400> 35
 cagagcctgt tcaacagccg gaccgggaag aactac 36
 30 <210> 36
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> CDR humanizada optimizada
 <400> 36
 tgggccagc 9
 40 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> CDR humanizada optimizada
 <400> 37
 50 atgcagagct tcaacctgcg gacc 24
 <210> 38
 <211> 360
 <212> ADN
 55 <213> artificial
 <220>
 <223> variante humanizada de VH
 60 <400> 38

ES 2 469 369 T3

	gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	60
	agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc	120
	cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca	180
	gagtacgcc ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt	240
	gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg	300
	gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc	360
	<210> 39 <211> 360 <212> ADN <213> artificial	
5		
	<220> <223> variante humanizada de VH	
10		
	<400> 39 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	
	agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc	60
	cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca	120
	gagtacgcc ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt	180
	gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg	240
	gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc	300
15	gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc	360
	<210> 40 <211> 360 <212> ADN <213> artificial	
20		
	<220> <223> variante humanizada de VH	
	<400> 40 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	
	agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc	60
	cctgaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca	120
	gagtacgcc ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt	180
	gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg	240
	gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc	300
25	gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc	360
	<210> 41 <211> 360 <212> ADN <213> artificial	
30		
	<220> <223> variante humanizada de VH	
35	<400> 41	

ES 2 469 369 T3

gaggtgaacc tggtaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaggg gectggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gactacgccg ccagcgtgag aggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgagacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggcaggggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 42
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atcaactgca agagcagcca gaggctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcacaaga 180
gaaagcggcg tgcccagacc cttttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
atcagctccc tgcaaggcca ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
cgacacctcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 43
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atcaactgca agagcagcca gaggctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcggccaga 180
gacagcggcg tgcccagacc cttttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
atcagctccc tgcaaggcca ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
cgacacctcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 44
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 44

ES 2 469 369 T3

	gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc	60
	atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc	120
	tggtatcagc agaagcccgg ccagtccccc aagctgctga tctactgggc cagcgcagaa	180
	gatagcggcg tgcccgtcgc ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc	240
	atcagccggg tgcaggccga ggacctcgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg	300
	cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag	336
	<210> 45 <211> 336 <212> ADN <213> artificial	
5		
	<220> <223> variante humanizada de VL	
10		
	<400> 45	
	gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc	60
	atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc	120
	tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga	180
	gactctggcg tgcccagacg attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc	240
	atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg	300
	cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag	336
15		
	<210> 46 <211> 336 <212> ADN <213> artificial	
20		
	<220> <223> variante humanizada de VL	
	<400> 46	
	gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc	60
	atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc	120
	tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga	180
	gactctggcg tgcccagacg attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc	240
	atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg	300
	cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag	336
25		
	<210> 47 <211> 336 <212> ADN <213> artificial	
30		
	<220> <223> variante humanizada de VL	
35	<400> 47	

ES 2 469 369 T3

gacatcgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga totactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 48
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 48
 gacatcgtga tgacccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga totactgggc cagcgccaga 180
 gatagcggcg tgcccagaccg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
 atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 49
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VH

<400> 49

ES 2 469 369 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaggg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacia agggcccagg cgtgttcccg ctagcccccga gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtgggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ttctctgtac agcaagctga ccgtggacia gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag 1350

<210> 50
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VH
 <400> 50

10

ES 2 469 369 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgcctgggt gcgccaggcc 120
cctgaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtagccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc 360
gccagcacia agggcccaag cgtgttccc ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
ggcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtgggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaacccc 780
gaggtgacct gtgtgggtgt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcctggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacia gagcagatgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag 1350

<210> 51
<211> 1350
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> variante humanizada de VH

<400> 51
gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

ES 2 469 369 T3

agctgcaccg ccagcggcct caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacia agggcccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaaacagc gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag cccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacia gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag 1350

<210> 52
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

10

<400> 52
 gaggtgaacc tgggtgagtc tggcggagga ctggtgcagc cggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggcct caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gactacgccg ccagcgtgag aggccggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

ES 2 469 369 T3

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagacaaa agggcccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggt gaacggcaag 960
gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag caggagagag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
ctggacagcg acggcagctt ttcctgtac agcaagctga ccgtggaaa gagcagatgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag 1350

<210> 53
<211> 657
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> variante humanizada de VL

<400> 53
gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctggcgca gcgggccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcacaaga 180
gaaagcggcg tgcccagacc cttttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgtc cgggtggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgcctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

15 <210> 54
<211> 657
<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

5

<400> 54

gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagccccc aagctgctga tctactgggc cagcgcagaga 180
gacagcggcg tgcccgaccg cttttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggtaggccc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 55

<211> 657

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> variante humanizada de VL

15

<400> 55

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagtccccc aagctgctga tctactgggc cagcgcagaga 180
gatagcggcg tgcccgtctg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
atcagccggg tgcaggccga ggacctcggc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggtaggccc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

20

<210> 56

<211> 657

<212> ADN

<213> artificial

25

<220>

<223> variante humanizada de VL

30

<400> 56

ES 2 469 369 T3

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggaggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacia cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caagggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 57
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

10

<400> 57
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggaggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacia cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caagggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 58
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

15

<220>
 <223> variante humanizada de VL

20

<400> 58

ES 2 469 369 T3

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgtg cgggtggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 59
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> variante humanizada de VL

10

<400> 59
 gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagcogga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcggcaga 180
 gatagcggcg tgcccagacc ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
 atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgtg cgggtggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 60
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

15

<220>
 <223> CDR optimizada

20

<400> 60
 cagtcctgt tcaactccc gaccggaag aactac 36

25

<210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 469 369 T3

<220>
 <223> CDR optimizada

 <400> 61
 5 tgggcctct 9

 <210> 62
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> artificial

 <220>
 <223> CDR optimizada

 <400> 62
 15 atgcagtctt tcaacctgcg gacc 24

 <210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> mus musculus

 <400> 63
 25 gaaactctgc attctcgctt cctg 24

 <210> 64
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> mus musculus

 <400> 64
 aggactcgtt tgtaccggtt ga 22

 <210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> mus musculus

 <400> 65
 40 tgcagattgg ctaccaact gttgca 26

 <210> 66
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> mus musculus

 <400> 66
 ctcttcatc ctctggaaa tc 22

 <210> 67
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> mus musculus

 <400> 67
 55 ccaaggaaag catagaggat gg 22

 <210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> mus musculus

 <400> 68
 65 gtggcatta tctatgcctt gg 22

 <210> 69

ES 2 469 369 T3

	<211> 22 <212> ADN <213> mus musculus	
5	<400> 69 cgaccctgct gtataagatg ac	22
	<210> 70 <211> 25 <212> ADN <213> mus musculus	
10		
	<400> 70 tattcctgct gagcctgctg ggaaa	25
15		
	<210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> mus musculus	
20		
	<400> 71 gggtcacct tactgataa ctac	24
	<210> 72 <211> 30 <212> ADN <213> mus musculus	
25		
	<400> 72 attagaaaca aagctaatgg ttacacaaca	30
30		
	<210> 73 <211> 33 <212> ADN <213> mus musculus	
35		
	<400> 73 gcaagagatg tcggttccaa ctacttgac tac	33
40		
	<210> 74 <211> 36 <212> ADN <213> mus musculus	
45		
	<400> 74 cagagtctgt tcaacagtcg aaccgaaag aactac	36
	<210> 75 <211> 9 <212> ADN <213> mus musculus	
50		
	<400> 75 tgggcatcc 9	
55		
	<210> 76 <211> 24 <212> ADN <213> mus musculus	
60		
	<400> 76 atgcaatctt ttaatcttcg gaccg	24
	<210> 77 <211> 100 <212> PRT	
65		

ES 2 469 369 T3

<213> homo sapiens

<400> 77

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg

5

100

<210> 78

<211> 101

10 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 78

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro
100

15

<210> 79

<211> 100

<212> PRT

<213> homo sapiens

20

<400> 79

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg
 100

5 <210> 80
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <400> 80
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
 100

15 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 81
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

20 <210> 82
 <211> 12

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 82

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

<210> 83

<211> 449

<212> PRT

10 <213> homo sapiens

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

ES 2 469 369 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

- <210> 84
- 5 <211> 219
- <212> PRT
- <213> homo sapiens
- <400> 84

ES 2 469 369 T3

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

<210> 85
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa es His o Ser

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa es Val o Leu

<220>

<221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa es Arg o Phe

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa es Ala o Asp

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa es Asp o Asn

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa es Ala o Leu

20

<400> 85

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Xaa Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Xaa Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Xaa Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
 <211> 112

25

<212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es Leu o Ser

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Ile o Met

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(40)

40

ES 2 469 369 T3

<223> Xaa es Asp o Ala

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa es Leu o Gln

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa es Tyr o Ala

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa es Ala o Asp

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (66)..(66)
 <223> Xaa es Asp o Ala

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa es Ser o Thr

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa es Gly o Glu

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa es Asp o Tyr

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa es Val o Leu

<400> 86
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Xaa Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

45 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Xaa Trp Tyr Xaa Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 87
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens

<400> 87
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Ala Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 88
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

15 <400> 88
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 89
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa es His o Ser
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> Xaa es Val o Leu
15
<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa es Arg o Phe
20
<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa es Ala o Asp
25
<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa es Asp o Asn
30
<220>
<221> misc_feature
<222> (81)..(81)
<223> Xaa es Ala o Leu
35
<400> 89

ES 2 469 369 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 Gly Xaa Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Xaa Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Xaa Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

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

Gly

- <210> 90
- <211> 219
- 5 <212> PRT
- <213> homo sapiens

- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <222> (9)..(9)
- <223> Xaa es Leu o Ser

- <220>
- <221> misc_feature
- 15 <222> (21)..(21)
- <223> Xaa es Ile o Met

- <220>
- <221> misc_feature

ES 2 469 369 T3

<222> (40)..(40)
 <223> Xaa es Asp o Ala

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa es Leu o Gln

 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (59)..(59)
 <223> Xaa es Tyr o Ala

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa es Ala o Asp

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (66)..(66)
 <223> Xaa es Asp o Ala

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa es Ser o Thr

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (74)..(74)
 <223> Xaa es Gly o Glu

 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa es Asp o Tyr

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa es Val o Leu

 <400> 90
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Xaa Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Xaa Trp Tyr Xaa Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

ES 2 469 369 T3

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser Gly Val
50 55 60

Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 91
<211> 449
5 <212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 91
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

10

ES 2 469 369 T3

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

ES 2 469 369 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

- <210> 92
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

5

<400> 92
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

10

ES 2 469 369 T3

	85		90		95
Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100		105		110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115		120		125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130		135		140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145		150		155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165		170		175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180		185		190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195		200		205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210		215		

<210> 93
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<400> 93
 gaggtacagt tgggtggaatc tgggggtggc ctggttcagc caggtggttc attgaagctg 60
 agctgtgccg cttctggatt cacattcact gataactata tgcactgggt ggcacaggcc 120
 agcggcaaag gcctggaatg ggtgggacgc atacggaaca aggccaacgg ctataccaca 180
 gcttatgcag catcagtcaa gggcagattt actatcagtc gtgacgattc taaaaatact 240
 gcctatctcc aatgaattc cctcaagacc gaggataccg cagtgtacta ctgcgctagg 300
 gacgtaggat ccaattactt cgactactgg ggcagggaa ccacccttac agtgtccagt 360

10

<210> 94
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

15

<400> 94
 gacatcgta tgaccagac ccctctctca ctcccagtca ctcttgaga gcccgcatcc 60
 atatcctgta ggagttctca gagtctgttc aactccagga cacgtaaaaa ctacctggac 120
 tggtaacctgc agaaaccgg ccagagtcca caactgctga tctattgggc ctcttacaga 180
 gcctcagggg tccccgatag attctctggg tccggcagcg gtaccgactt cactttgaag 240
 attagccgcg tggaagctga agatgtgggt gtgtattatt gcatgcagag cttaaatctc 300
 cggacatttg gccaggaac caaggtggag atcaag 336

20

ES 2 469 369 T3

<210> 95
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<400> 95
 gaggtacagt tgggtgaatc tgggggtggc ctggttcagc caggtggttc attgaagctg 60
 agctgtgccg cttctggatt cacattcact gataactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 agcggcaaag gcctggaatg ggtgggacgc atacggaaca aggccaacgg ctataccaca 180
 gcttatgcag catcagtcaa gggcagatct actatcagtc gtgacgattc taaaaatact 240
 gcctatctcc aatgaattc cctcaagacc gaggataccg cagtgtacta ctgctctagg 300
 gacgtaggat ccaattactt cgactactgg gggcagggaa ccacccttac agtgtccagt 360
 gcaagcacia aagggcctag cgttttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag cccccgagct gctgggaggga 720
 cccagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggagggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag caggagaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gttctacc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacia gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cccagggc 1347

10

<210> 96
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 96

ES 2 469 369 T3

gacatcgta	tgaccagac	ccctctctca	ctcccagtca	ctcctggaga	gcccgcattc	60
atatacctgta	ggagttctca	gagtctgttc	aactccagga	cacgtaaaaa	ctacctggac	120
tggtagcctgc	agaaaccgg	ccagagtcca	caactgctga	tctattgggc	ctcttacaga	180
gcctcagggg	tccccgatag	attctctggg	tccggcagcg	gtaccgactt	cactttgaag	240
attagccggg	tggaagctga	agatgtgggt	gtgtattatt	gcatgcagag	ctttaatctc	300
cggacatttg	gccagggaac	caaggtggag	atcaagcgtg	cggtagccgc	tcccagcgtg	360
ttcatcttcc	ccccaaagca	cgagcagctg	aagagcggca	ccgccagcgt	ggtgtgtctg	420
ctgaacaact	tctaccag	ggaggccaag	gtgcagtgga	aggtggacia	cgccctgcag	480
agcggcaaca	gccaggagag	cgtcaccgag	caggacagca	aggactccac	ctacagcctg	540
agcagcacc	tgaccctgag	caaggccgac	tacgagaagc	acaaggtgta	cgcctgtgag	600
gtgaccacc	agggcctgtc	cagccccgtg	accaagagct	tcaacagggg	cgagtgc	657

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo humanizado que puede unirse específicamente a CXCR4, o un fragmento funcional del mismo, seleccionándose dicho fragmento funcional de entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, comprende cadenas pesadas y ligeras, presentando dicha cadena pesada las CDR que consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y presentando dicha cadena ligera las CDR que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en el que dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 4, 5 y 6 y dichas CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden respectivamente las secuencias SEC ID nº 7, 8 y 9.
- 10 2. Anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 10, nº 11, nº 12, nº 13, nº 83, nº 85 o nº 87 y una región variable de la cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 14, nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19, nº 20, nº 84, nº 86 o nº 88.
- 15 3. Anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 21, nº 22, nº 23, nº 24, nº 89 o nº 91 y una cadena ligera de secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 25, nº 26, nº 27, nº 28, nº 29, nº 30, nº 31, nº 90 o nº 92.
- 20 4. Anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- 25 - anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 16;
- 30 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 27;
- 35 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 17;
- 40 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 28;
- 45 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 18;
- 50 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 29;
- 55 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 11 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 19;
- 60 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 22 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 30;
- 65 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 12 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 14;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 23 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 25;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 12 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 15;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 23 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 26;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 29;
 - 5 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 19;
 - 10 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 30;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de la cadena pesada de secuencia SEC ID nº 87 y una región variable de la cadena ligera de secuencia SEC ID nº 20;
 - 15 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEC ID nº 91 y una cadena ligera de secuencia SEC ID nº 31.
5. Molécula de ácido nucleico aislado caracterizada porque se selecciona de entre los ácidos nucleicos siguientes:
- 20 a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo humanizado o un fragmento funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- 25 b) un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico como se define en a);
- c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que pueden hibridar en condiciones muy estrictas con por lo menos una de las 3 CDR de una cadena pesada que comprende las secuencias de ácido nucleico SEC ID nº 38 a nº 41, nº 49 a nº 52, nº 93 o nº 95; y
- 30 d) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que pueden hibridar bajo condiciones muy estrictas con por lo menos una de las 3 CDR de una cadena ligera que comprende las secuencias de ácido nucleico SEC ID nº 42 a nº 48, nº 53 a nº 59, nº 94 o nº 96.
6. Molécula de ácido nucleico aislado según la reivindicación 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- 35 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado, comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada una secuencia nucleotídica CDR-H1 de SEC ID nº 32, una secuencia nucleotídica CDR-H2 de SEC ID nº 33 y una secuencia nucleotídica CDR-H3 de SEC ID nº 34;
- 40 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado, comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de región variable de la cadena ligera una secuencia nucleotídica CDR-L1 de SEC ID nº 35 o nº 60, una secuencia nucleotídica CDR-L2 de SEC ID nº 36 o nº 61 y una secuencia nucleotídica CDR-L3 de SEC ID nº 37 o nº 62; y
- 45 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado,
- 50 i) comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada una secuencia nucleotídica CDR-H1 de SEC ID nº 32, una secuencia nucleotídica CDR-H2 de SEC ID nº 33 y una secuencia nucleotídica CDR-H3 de SEC ID nº 34; y
- 55 ii) comprendiendo dicha secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera una secuencia nucleotídica CDR-L1 de SEC ID nº 35 o nº 60, una secuencia nucleotídica CDR-L2 de SEC ID nº 36 o nº 61 y una secuencia nucleotídica CDR-L3 de SEC ID nº 37 o nº 62.
7. Vector compuesto de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.
- 60 8. Célula anfitriona que comprende un vector según la reivindicación 7.
9. Animal transgénico, excepto el hombre, que comprende una célula transformada por un vector según la reivindicación 8.
- 65 10. Procedimiento para producir un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, caracterizado porque dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- el cultivo en un medio de y en las condiciones adecuadas de cultivo para una célula anfitriona según la reivindicación 8; y
- 5 - recuperar dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producido así a partir del medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.
- 10 11. Anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como fármaco.
- 15 12. Composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 11.
- 20 13. Composición según la reivindicación 12, caracterizada porque comprende, además, como un producto de combinación para su utilización de una manera simultánea, separada o prolongada, un anticuerpo antitumoral aparte de un anticuerpo dirigido contra CXCR4.
- 25 14. Composición según una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación o conjugación para su utilización de una manera simultánea, separada o prolongada, un agente citotóxico/citostático, una toxina celular o un radioisótopo.
- 30 15. Composición según una de las reivindicaciones 12 a 13, para su utilización como fármaco.
- 35 16. Anticuerpo humanizado, o fragmento funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 11, y/o composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, para la prevención o el tratamiento del cáncer.
- 40 17. Anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, y/o una composición según la reivindicación 16, caracterizado porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado de entre cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de colon.
- 45 18. Procedimiento para la detección *in vitro* de la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa CXCR4 en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:
- (a) poner en contacto una muestra del paciente con un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4 u 11; y
 - (b) detectar la unión de dicho anticuerpo con la muestra.
- 50 19. Kit que comprende por lo menos un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 1 a 4 u 11, estando dicho anticuerpo preferentemente marcado.

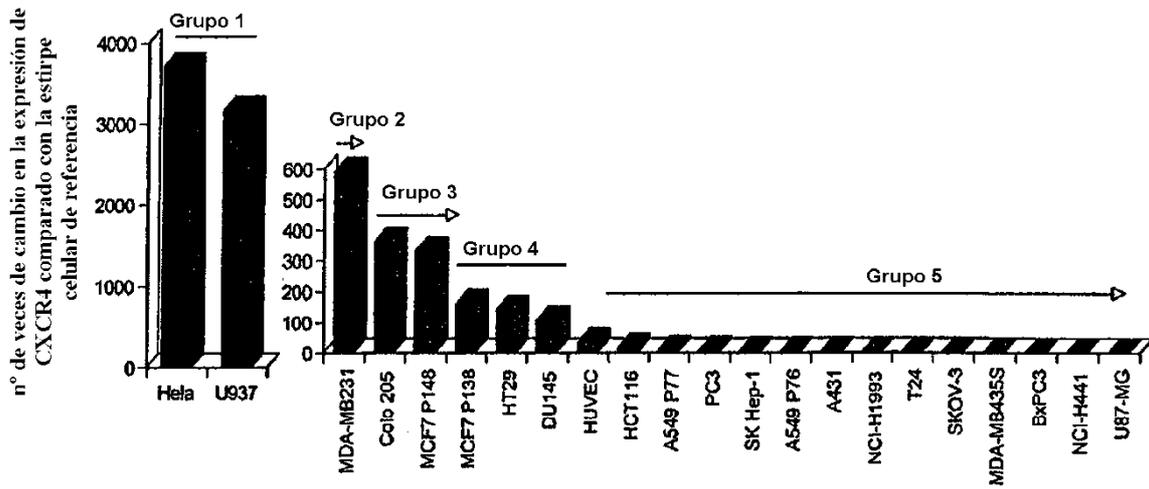


FIGURA 1A

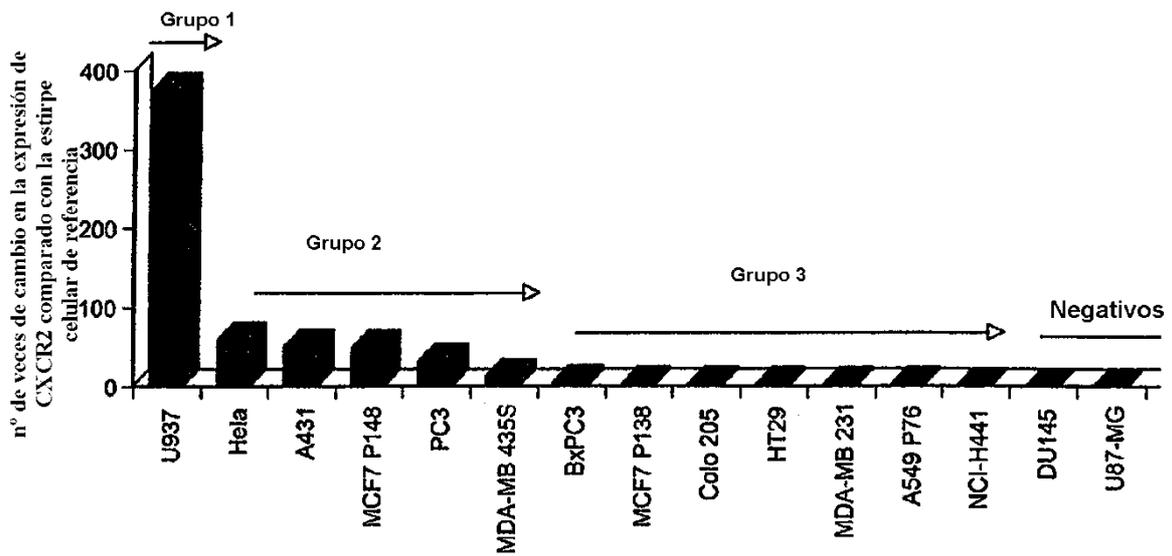


FIGURA 1B

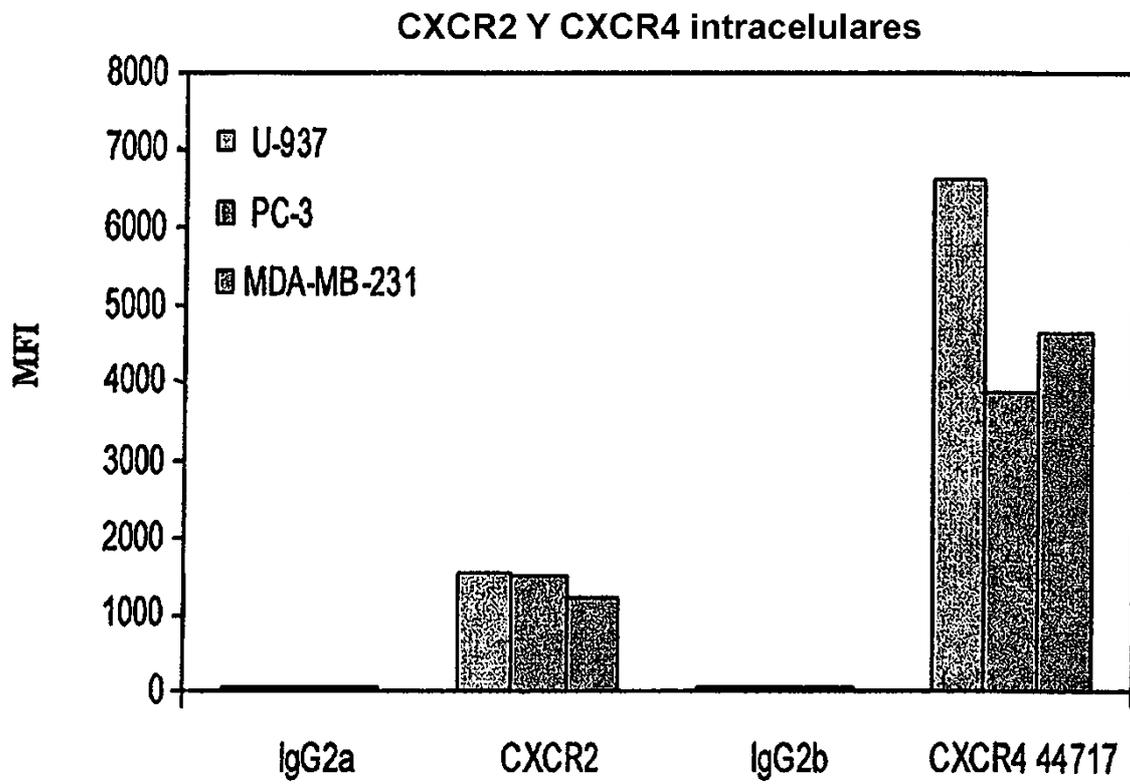


FIGURA 2

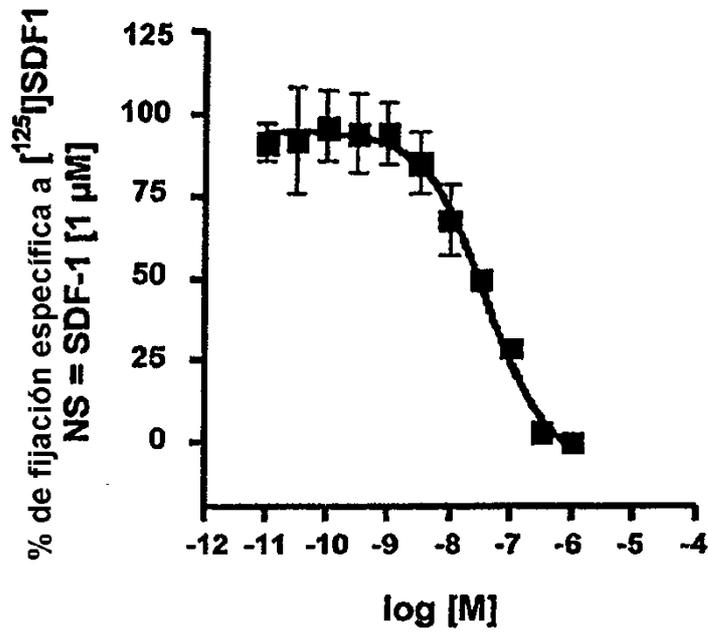


FIGURA 3A

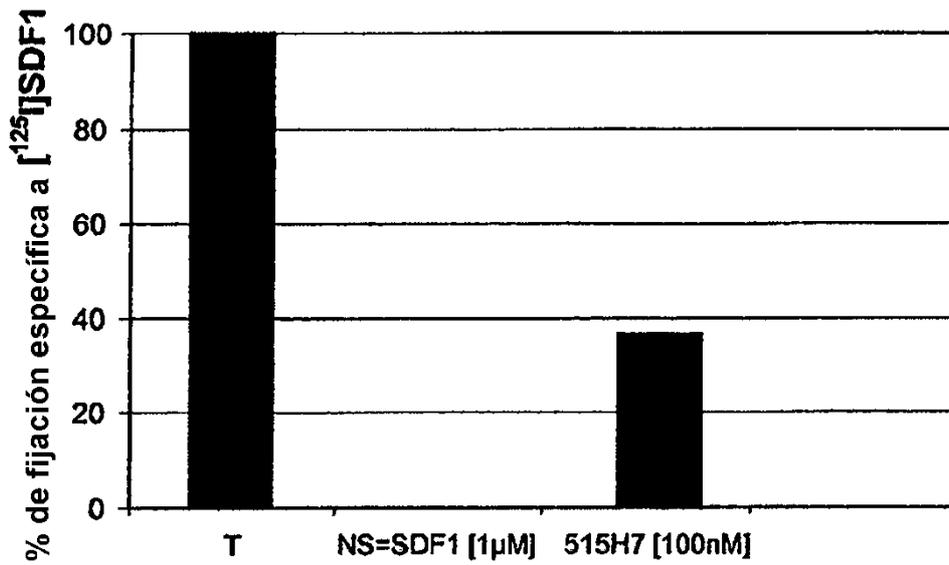


FIGURA 3B

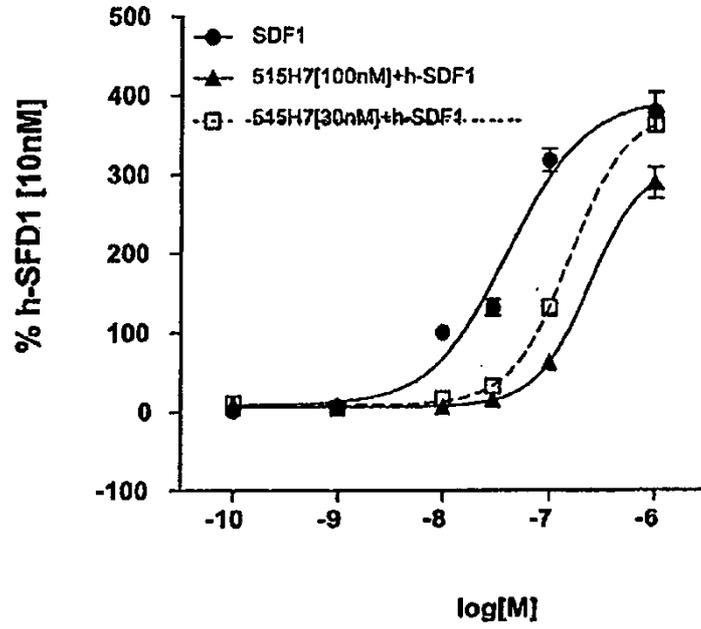


FIGURA 4

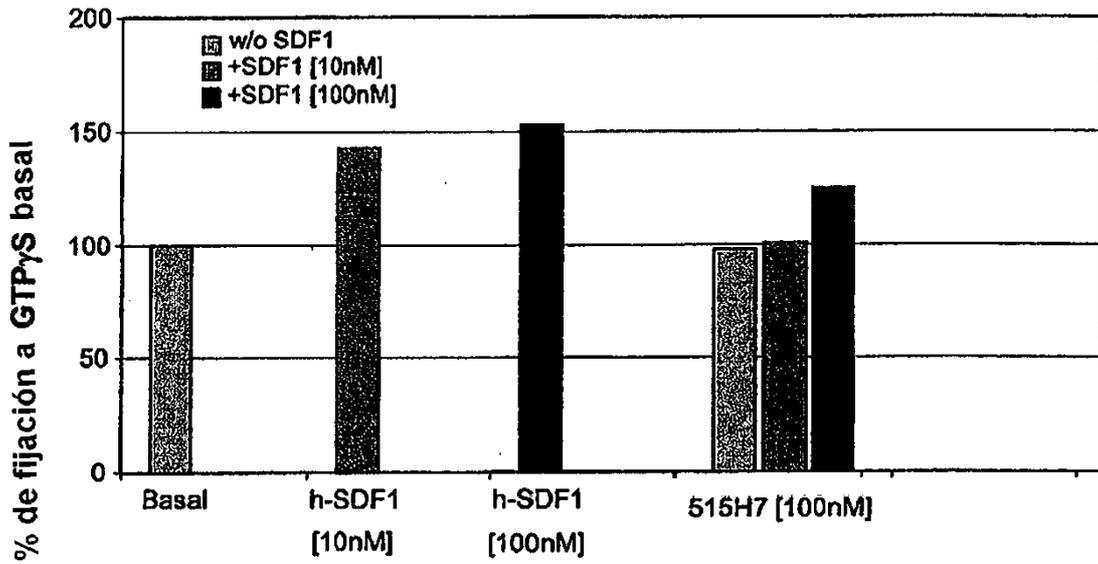


FIGURA 5

FIGURA 6A

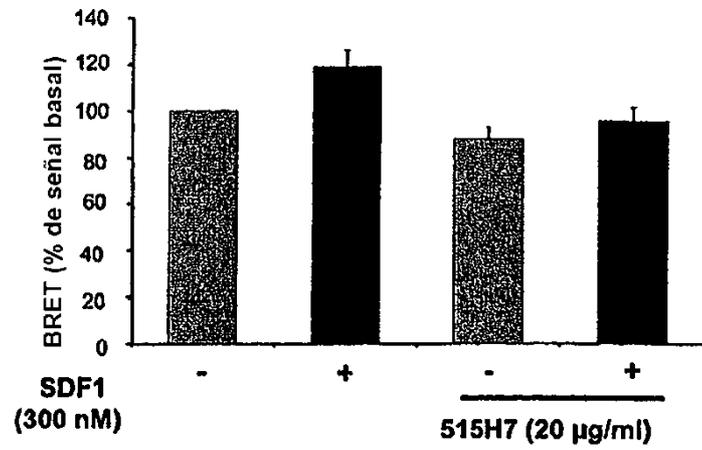


FIGURA 6B

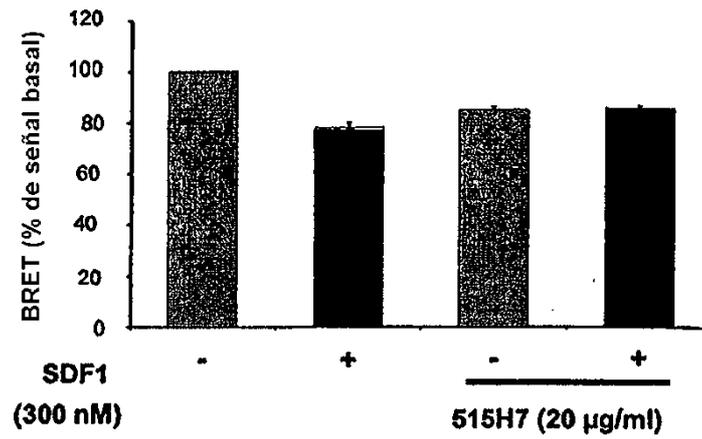
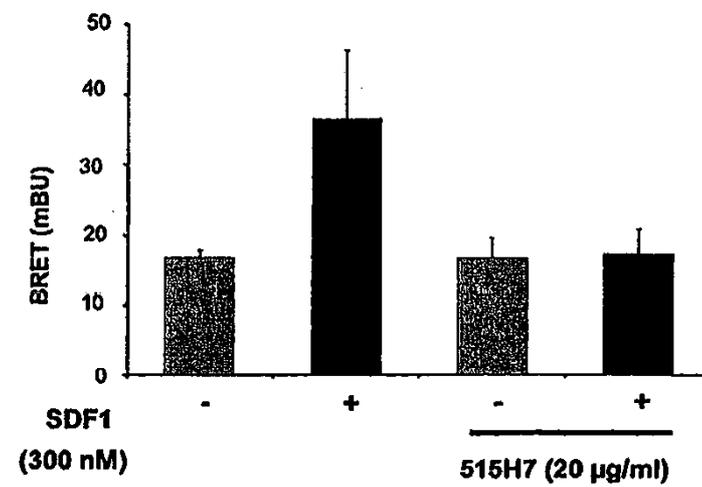


FIGURA 6C



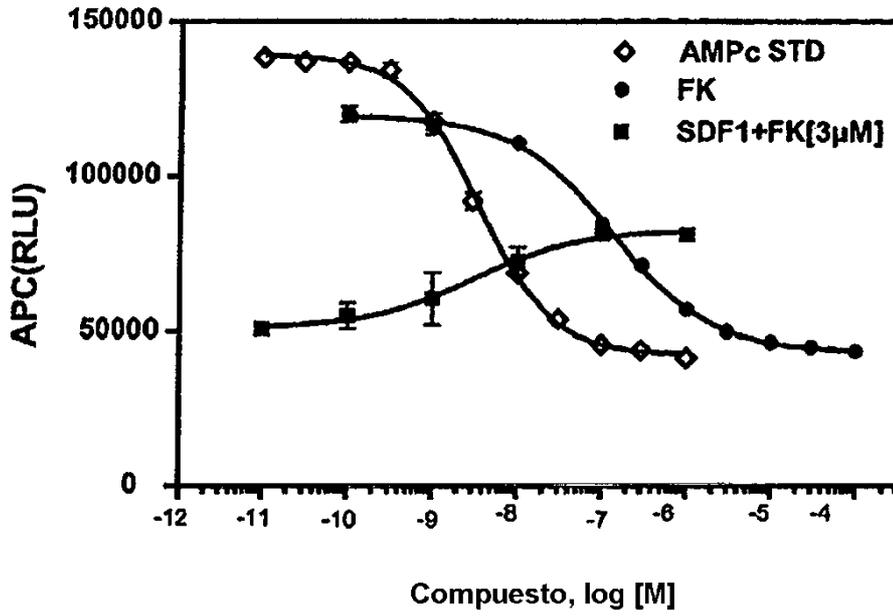


FIGURA 7A

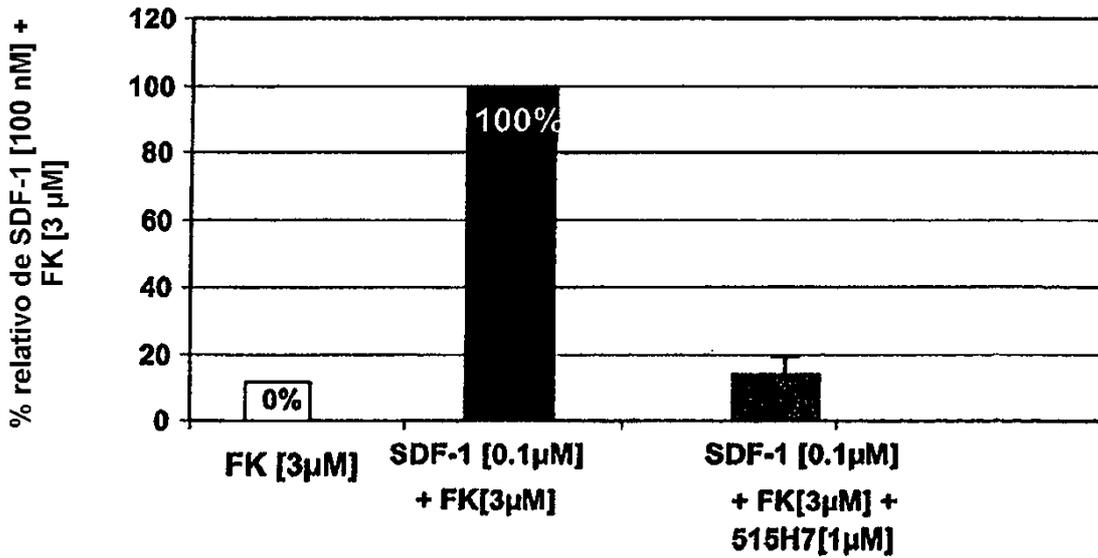


FIGURA 7B

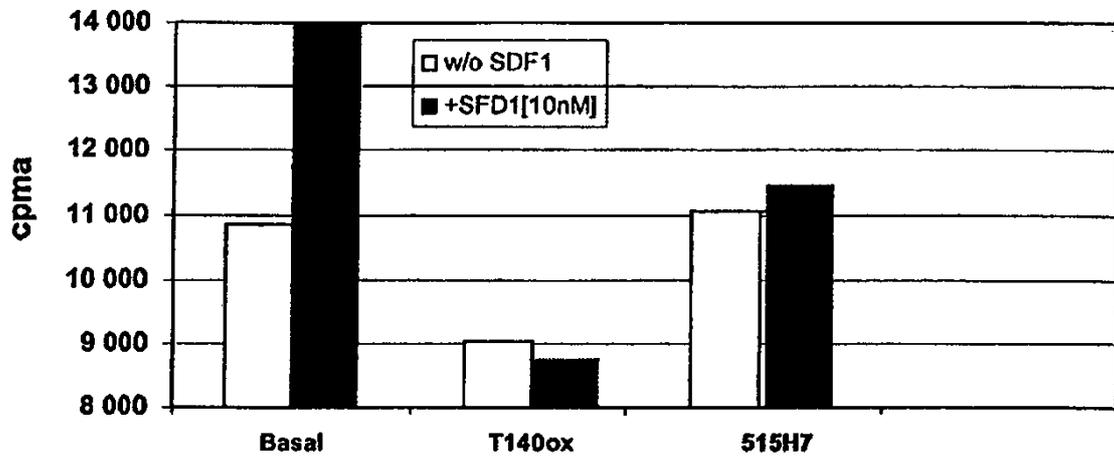


FIGURA 8

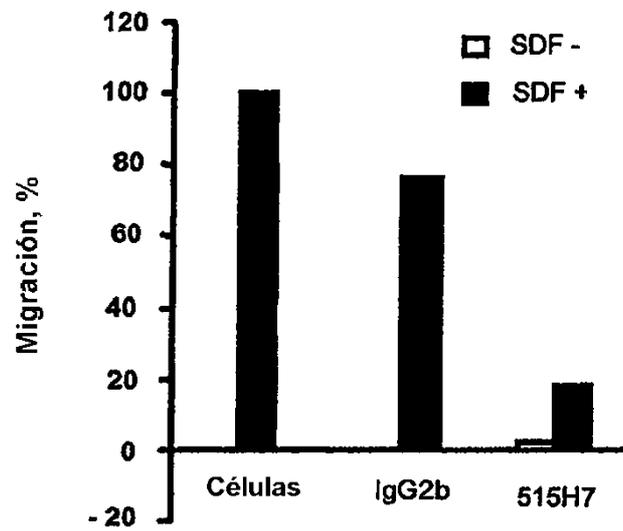


FIGURA 9

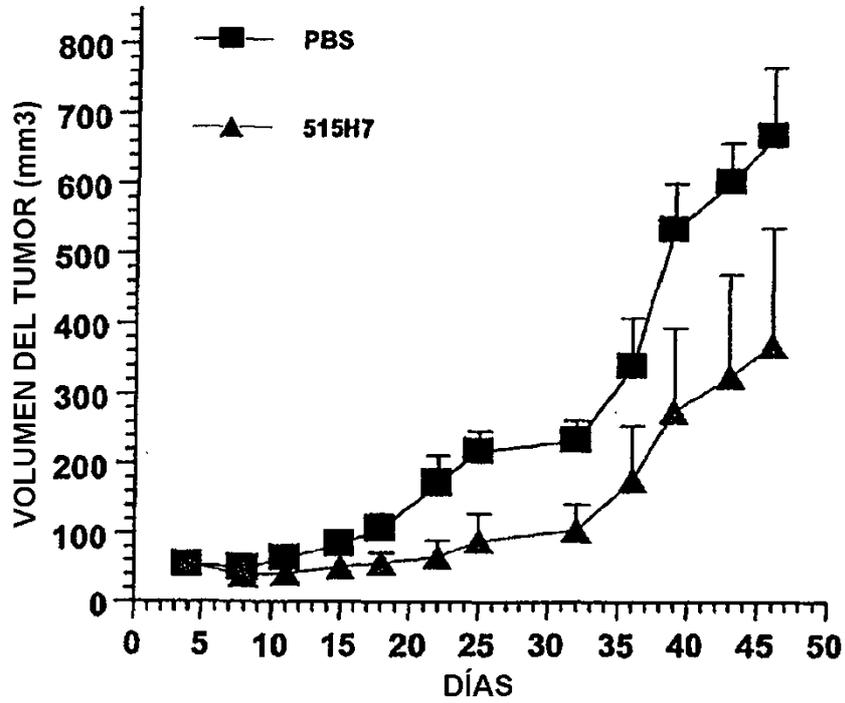


FIGURA 10

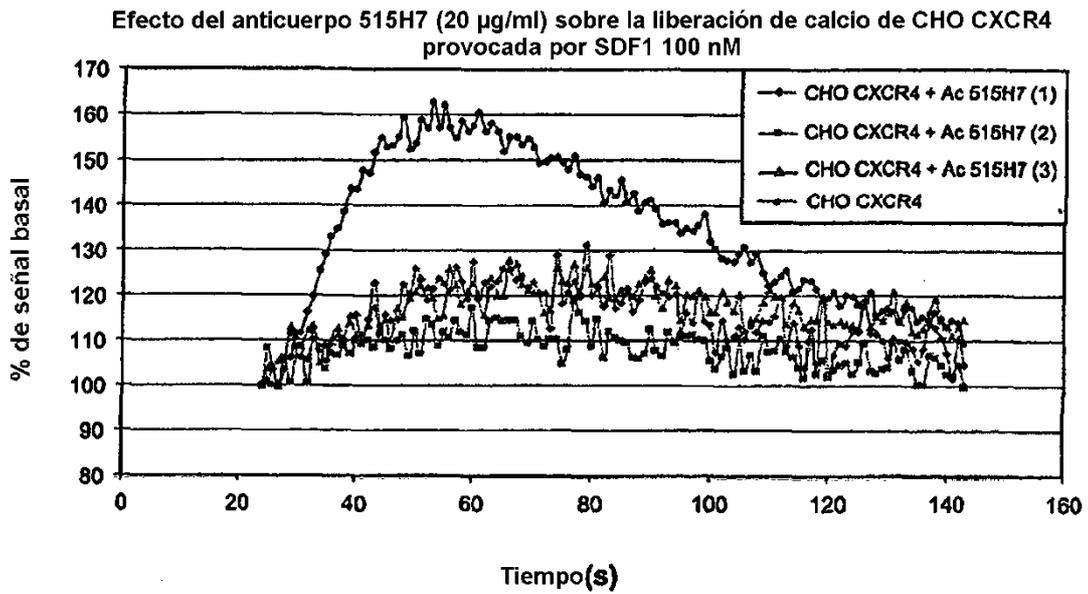


FIGURA 11A

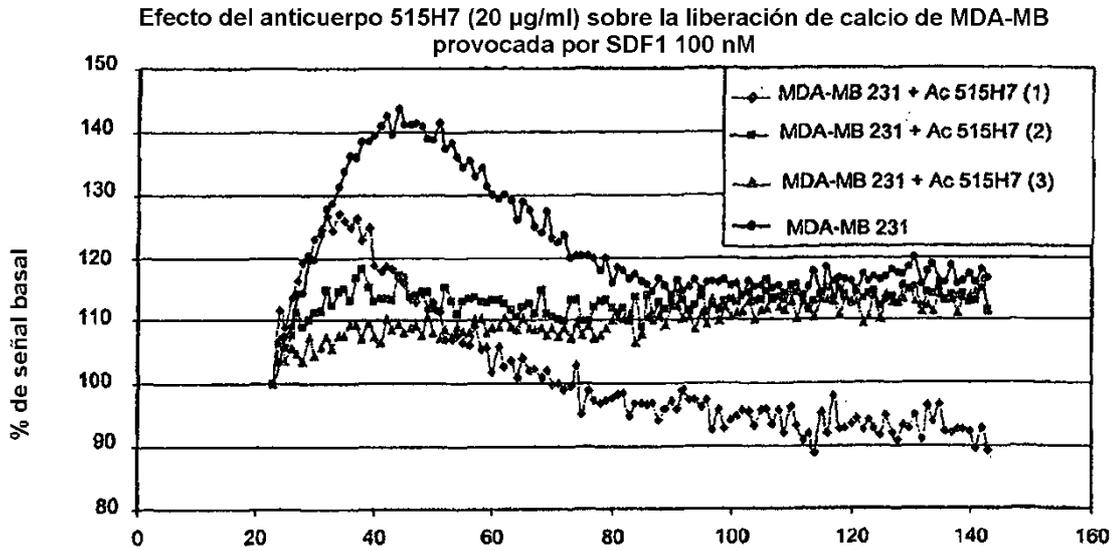


FIGURA 11B

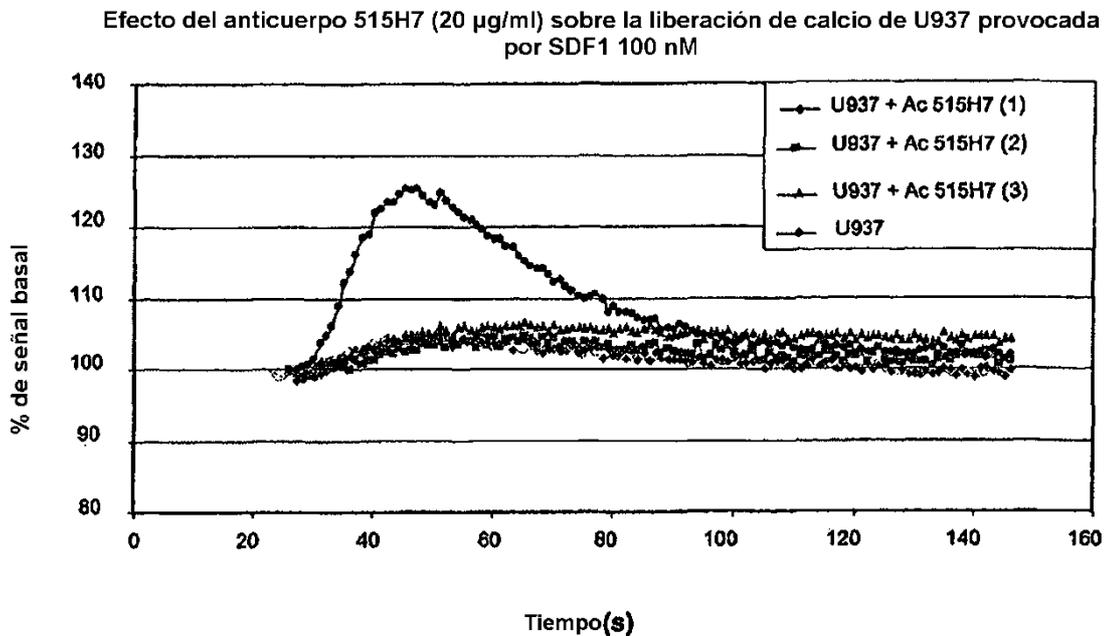


FIGURA 11C

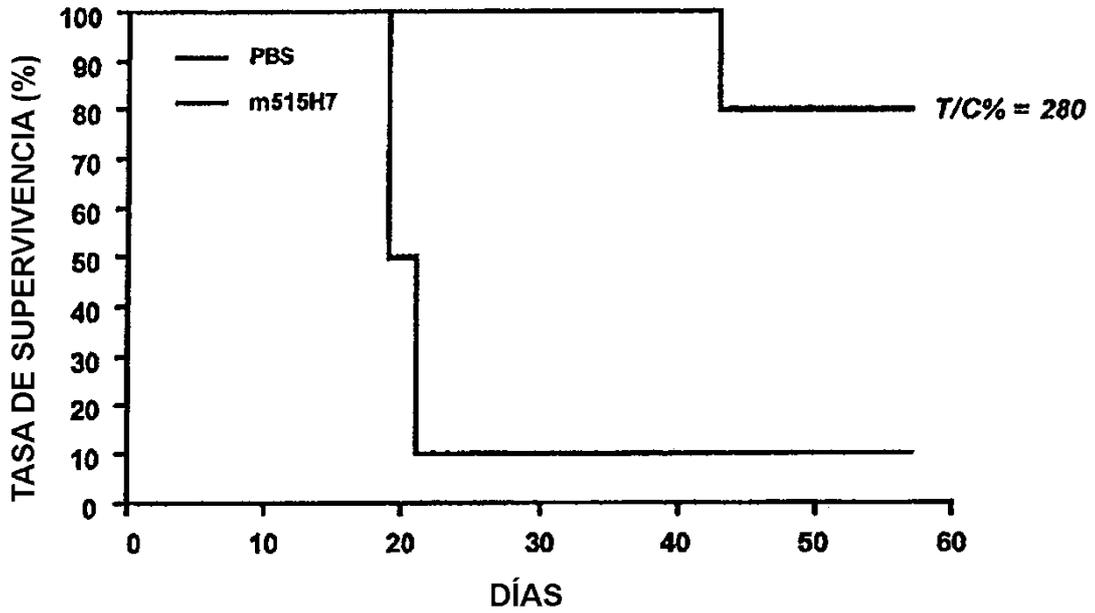


FIGURA 12

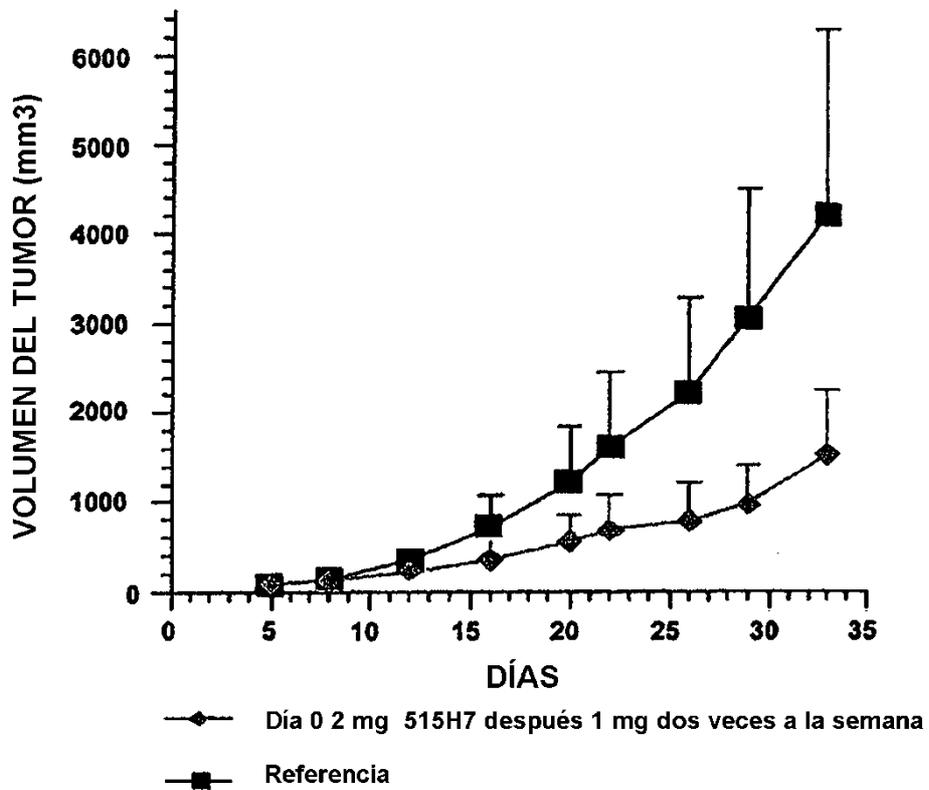


FIGURA 13

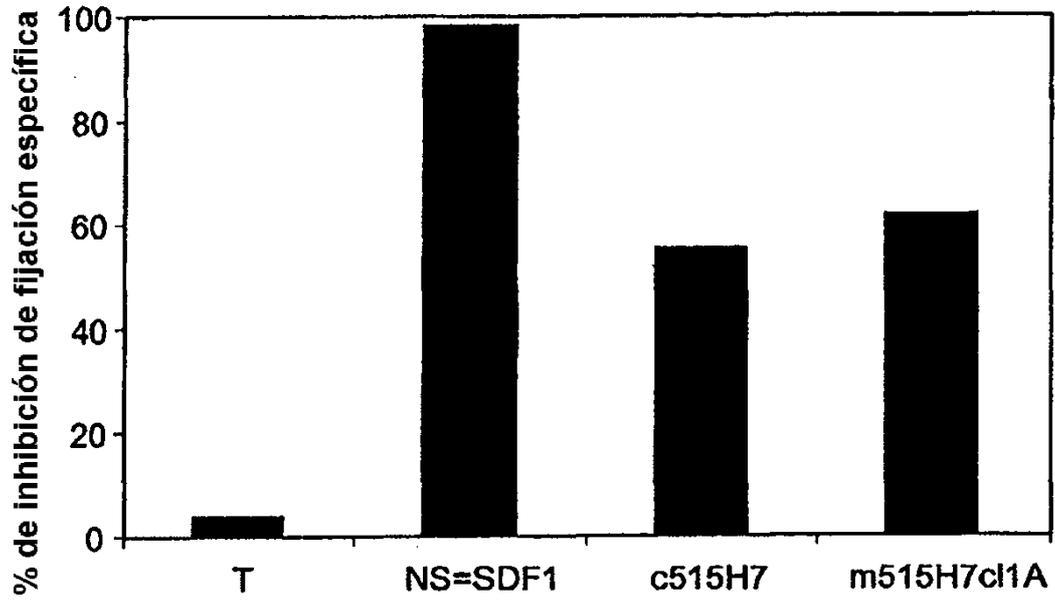


FIGURA 14

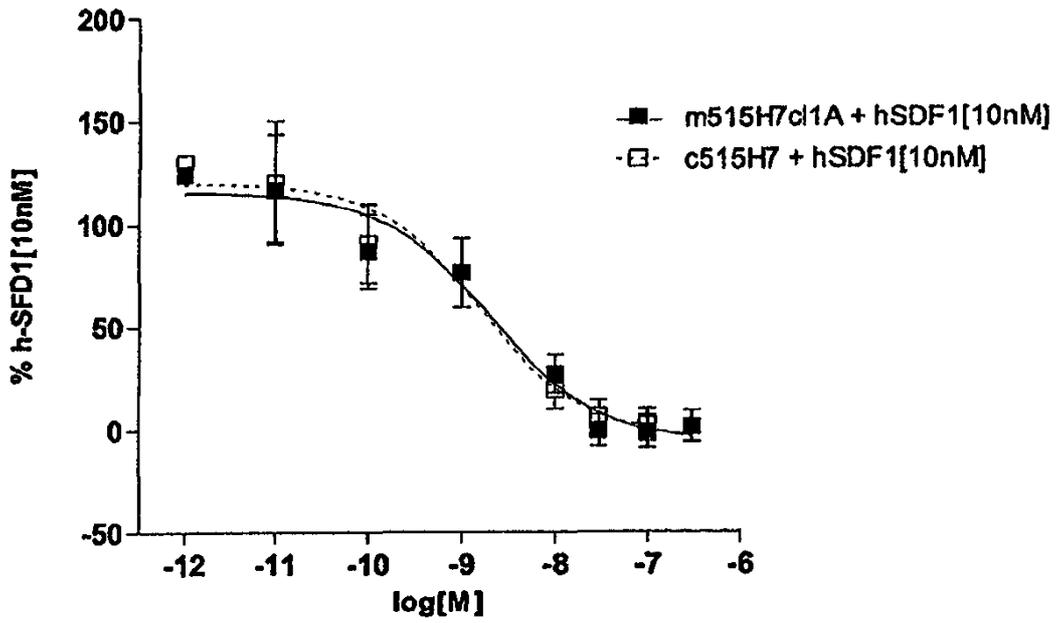


FIGURA 15

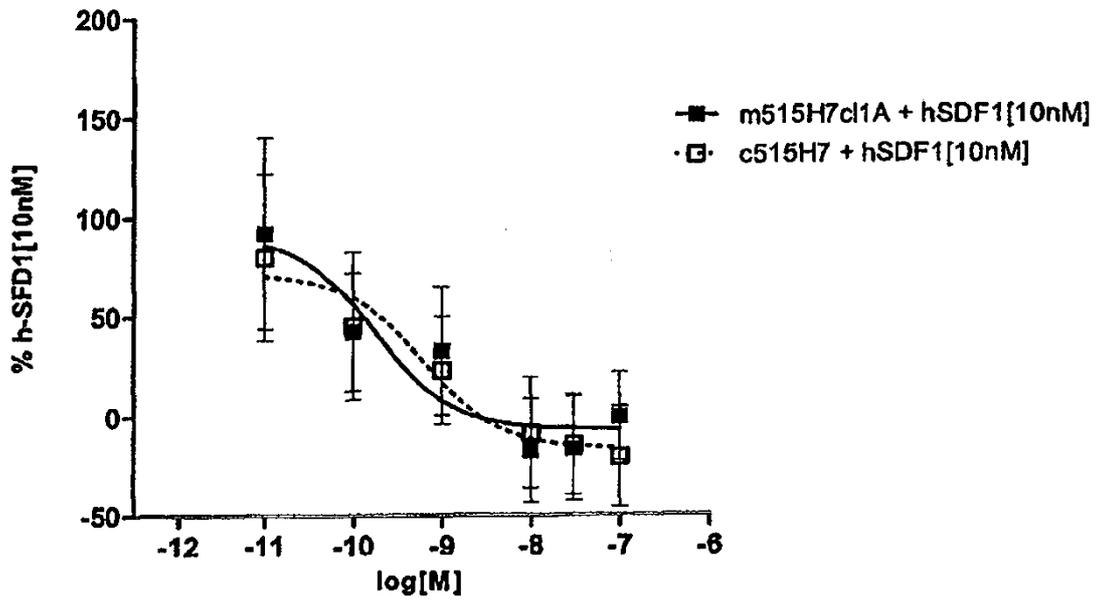


FIGURA 16

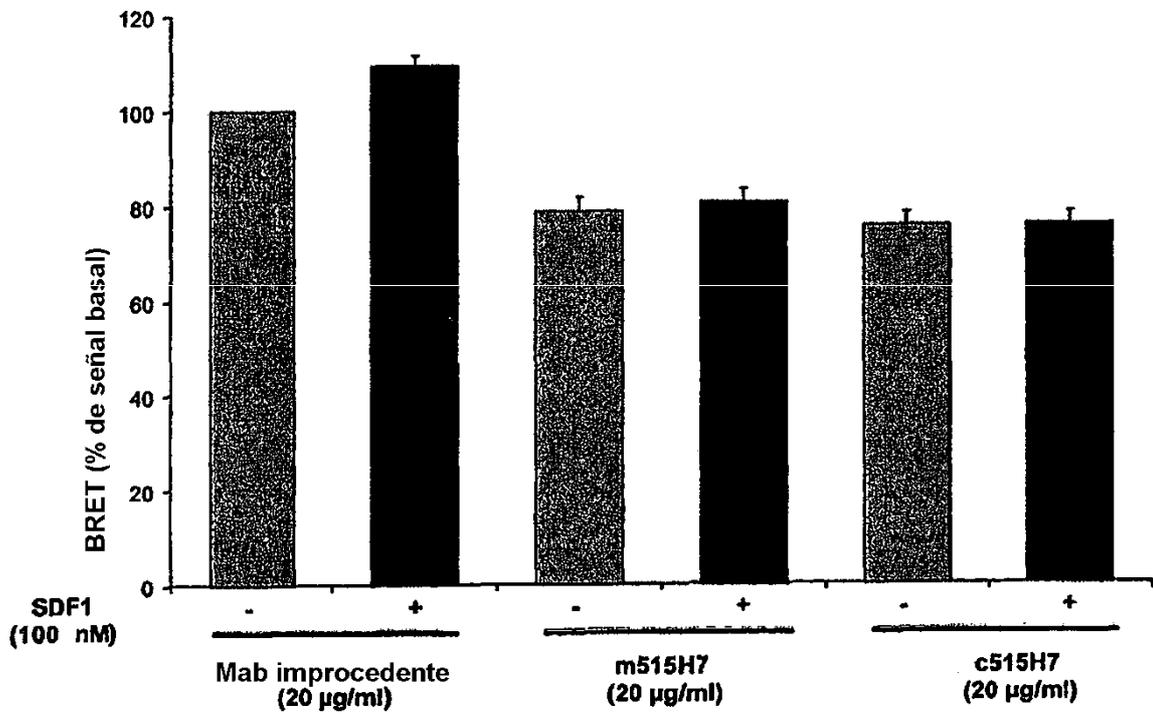


FIGURA 17A

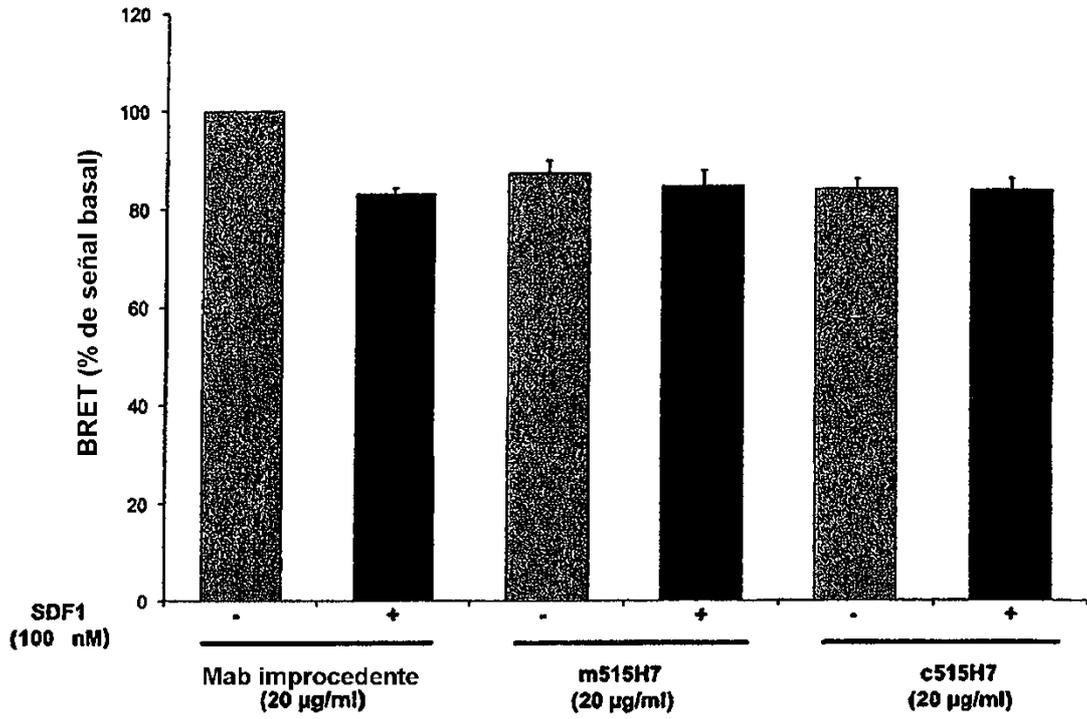


FIGURA 17B

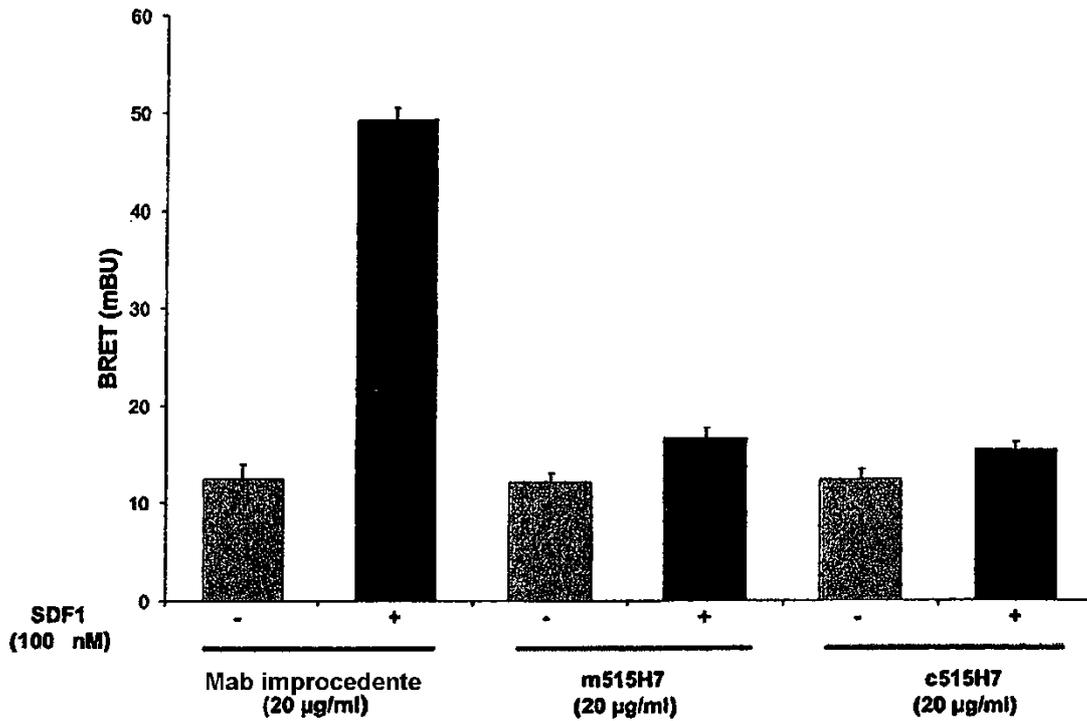


FIGURA 17C

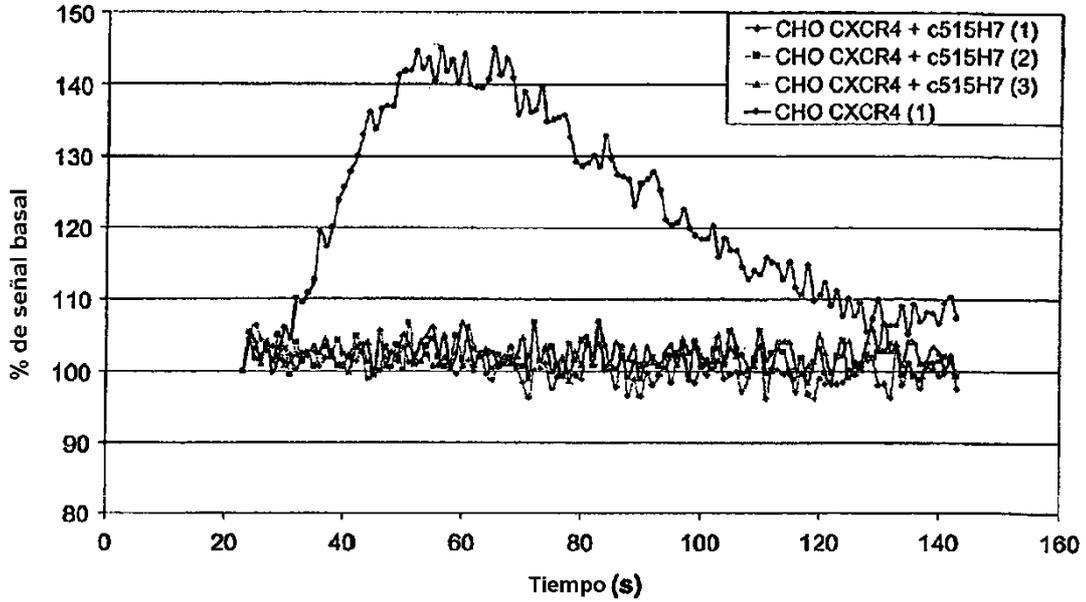


FIGURA 18A

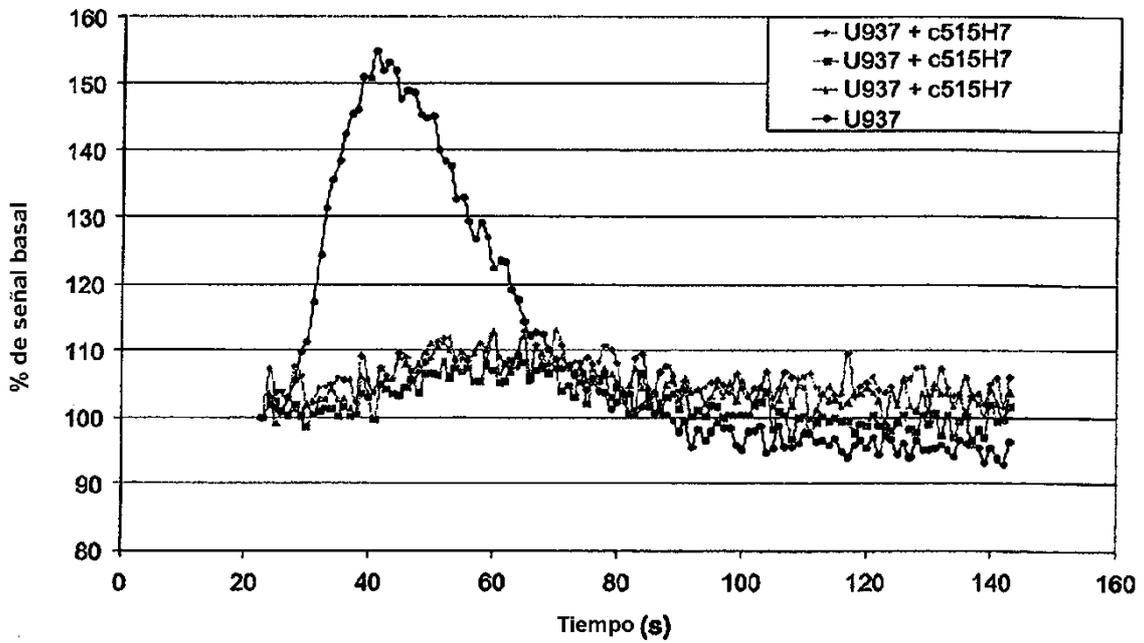


FIGURA 18B

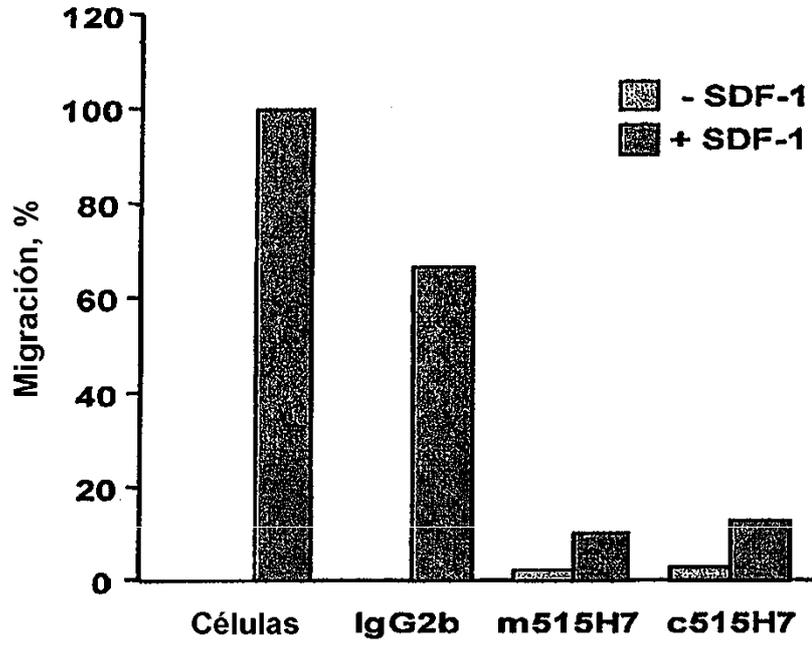


FIGURA 19

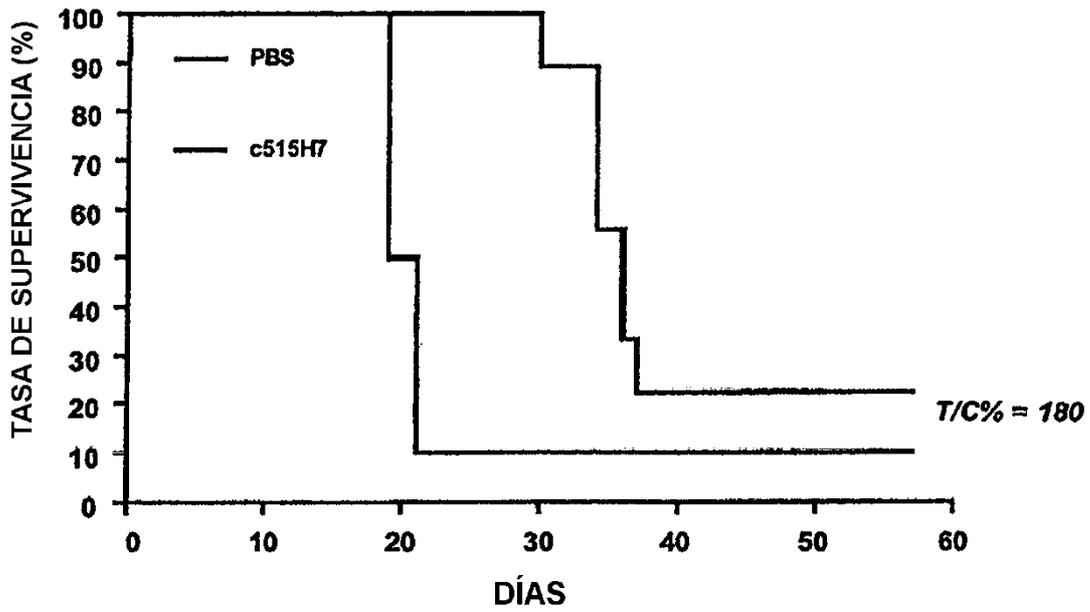


FIGURA 20

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VH IGHV3-49*04	EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCATS			GFTF...TDNY			MSWVRQPPGKALEWLG			IRNKANGYTT		
	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS			GFTF...GDYA			MSWVRQAPGKLEWVGF			IRSKAYGGTT		
Prioridad	N G AT			P A L			3 3 1					
VH1	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS			GFTF...TDNY			MSWVRQAPGKLEWVGF			IRNKANGYTT		
VH2	EVNLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS			GFTF...TDNY			MSWVRQAPGKLEWLG			IRNKANGYTT		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)			FR4-IMGT (116-125)		
	70	80	90	100						
515H7 VH IGHV3-49*04 IGHJ4*01	DYSASVR.GRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYC				ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS		
	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC				TR			YFDYW GQGTTLTVSS		
Prioridad	D S R	N Q L	A R A	S T				T		
	1 3 1	1 3 1	2 23	3 3				3		
VH1	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC				ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS		
VH2	DYSASVR.GRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYC				ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS		

FIGURA 21

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL IGKV4-1*01	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS			QSLFNSRTRKNY			LAWYQQKPGQSPKLLIY			WA.....S		
	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			QSVLYSSNNKNY			LAWYQQKPGQPPKLLIY			WA.....S		
Prioridad	S S	A KV MS				S			2			
	3 2	3 33 22										
VL1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			QSLFNSRTRKNY			LAWYQQKPGQPPKLLIY			WA.....S		
VL3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS			QSLFNSRTRKNY			LAWYQQKPGQPPKLLIY			WA.....S		
VL2	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS			QSLFNSRTRKNY			LAWYQQKPGQSPKLLIY			WA.....S		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (106-113)			FR4-IMGT (114-123)		
	70	80	90	100						
515H7 VL IGKV4-1*01 IGKJ1*01	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC				MQSFNLRT			FGQGTKVEIK		
	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC							WT FGQGTKVEIK		
Prioridad	A D	A T	E Y	RV L						
	1 1	2 1	1 1	22 2						
VL1	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC				MQSFNLRT			FGQGTKVEIK		
VL3	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISLQAEDVAVYYC				MQSFNLRT			FGQGTKVEIK		
VL2	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC				MQSFNLRT			FGQGTKVEIK		

FIGURA 22

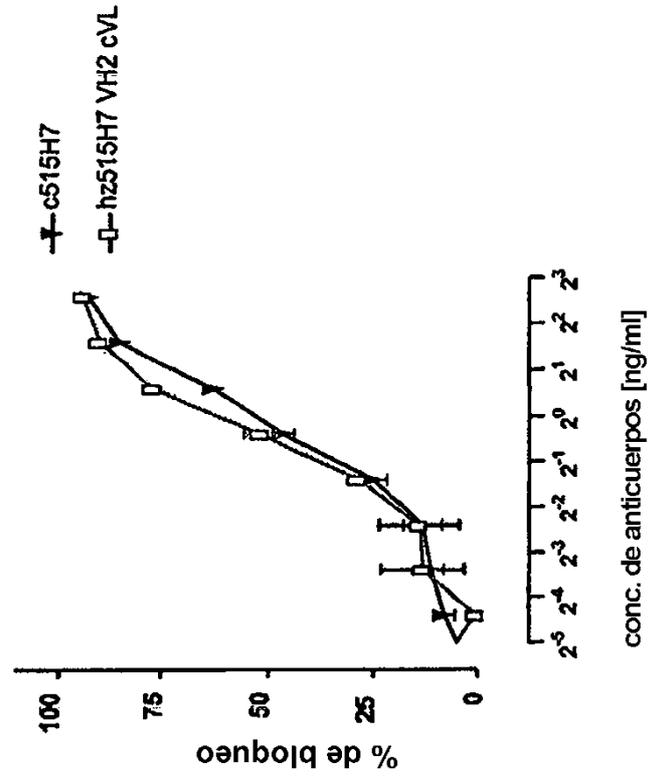


FIGURA 23B

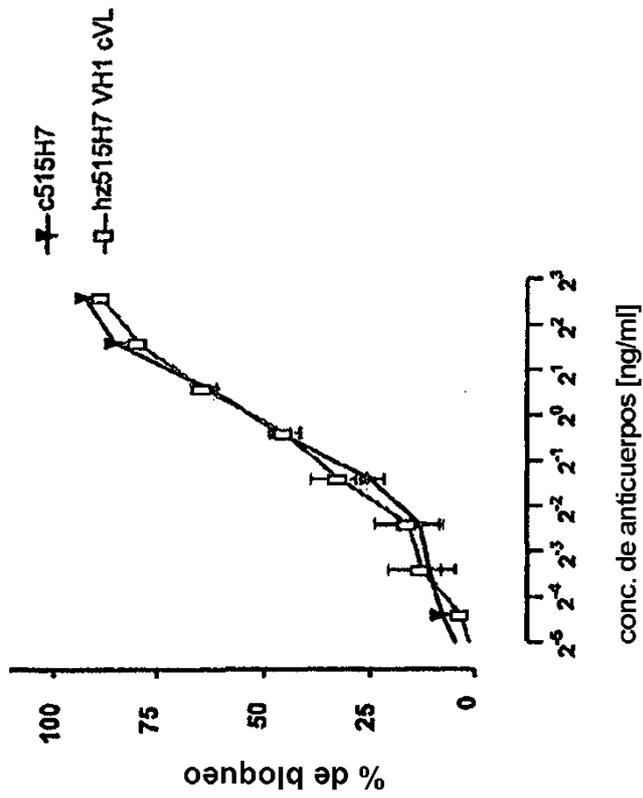


FIGURA 23A

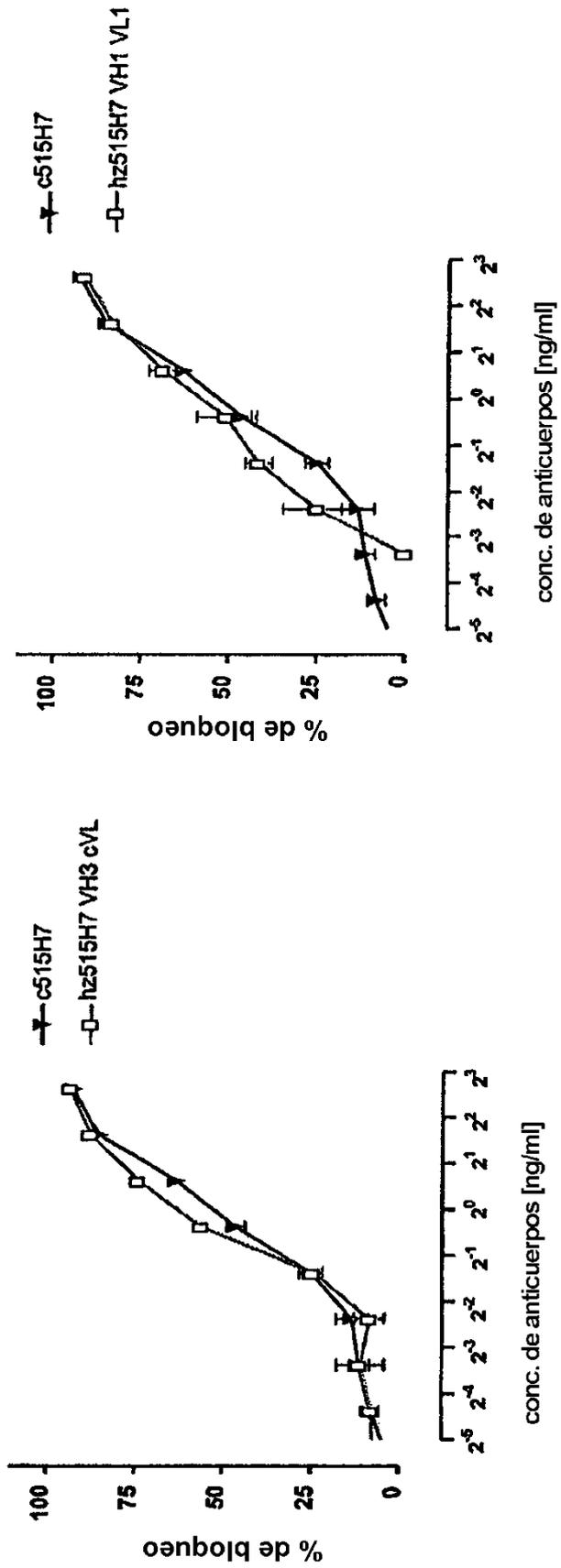


FIGURA 23C

FIGURA 23D

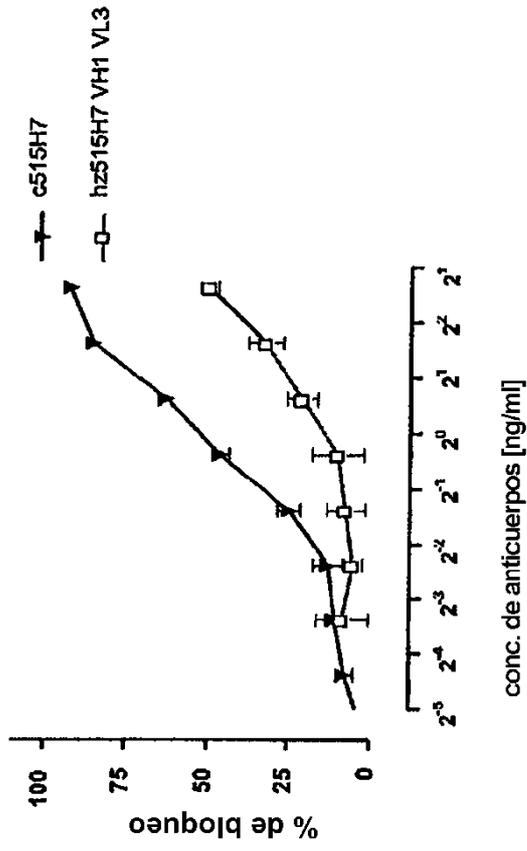


FIGURA 23F

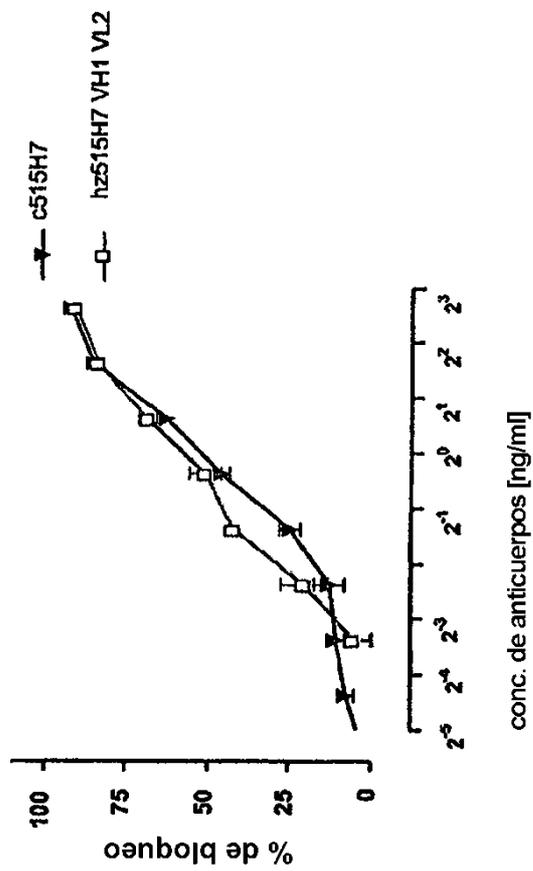


FIGURA 23E

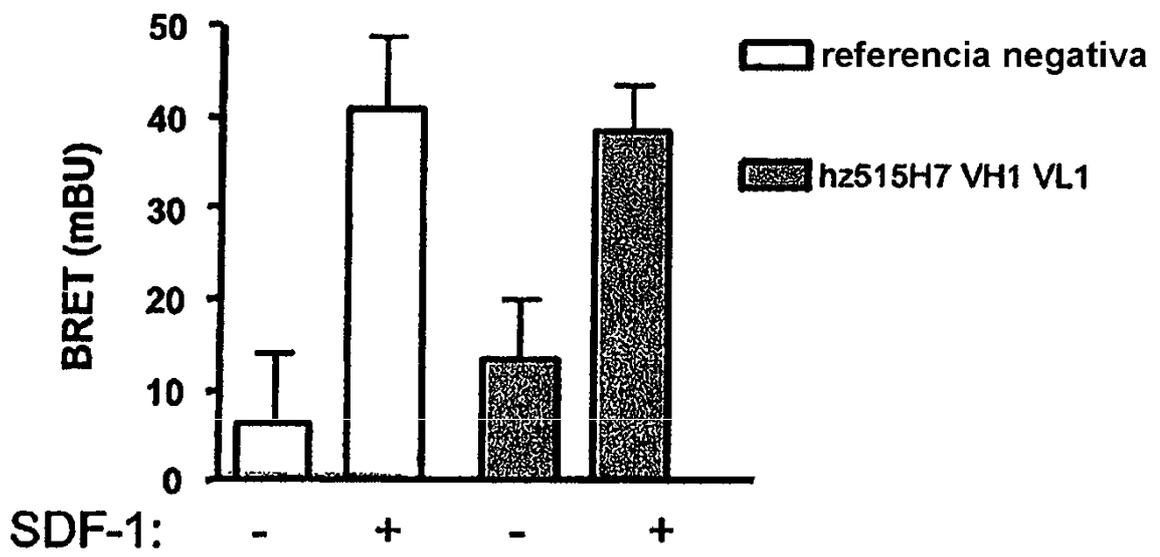


FIGURA 24

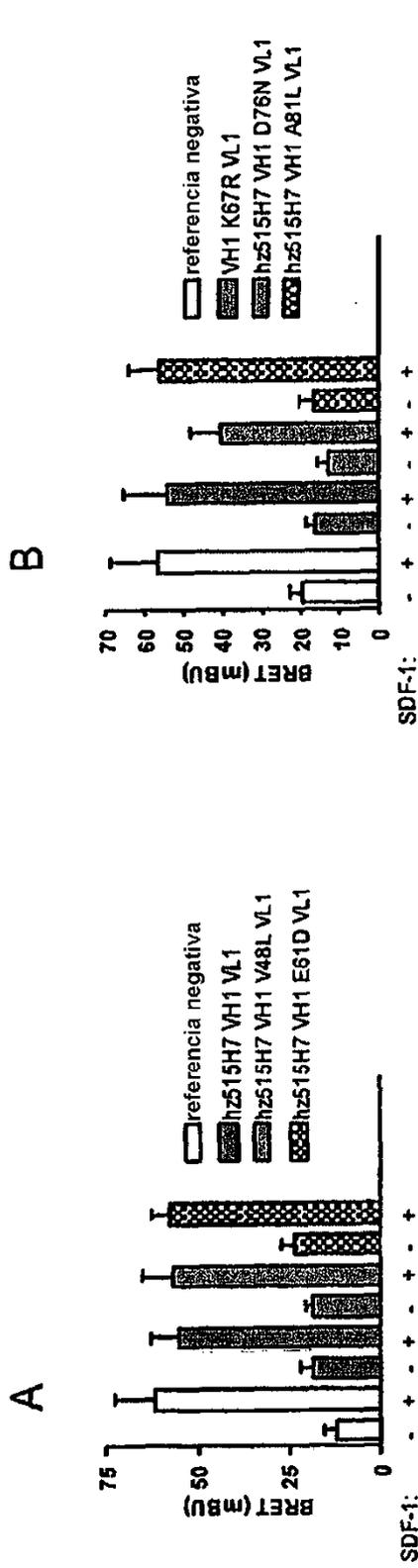


FIGURA 25B – FIGURA 25D

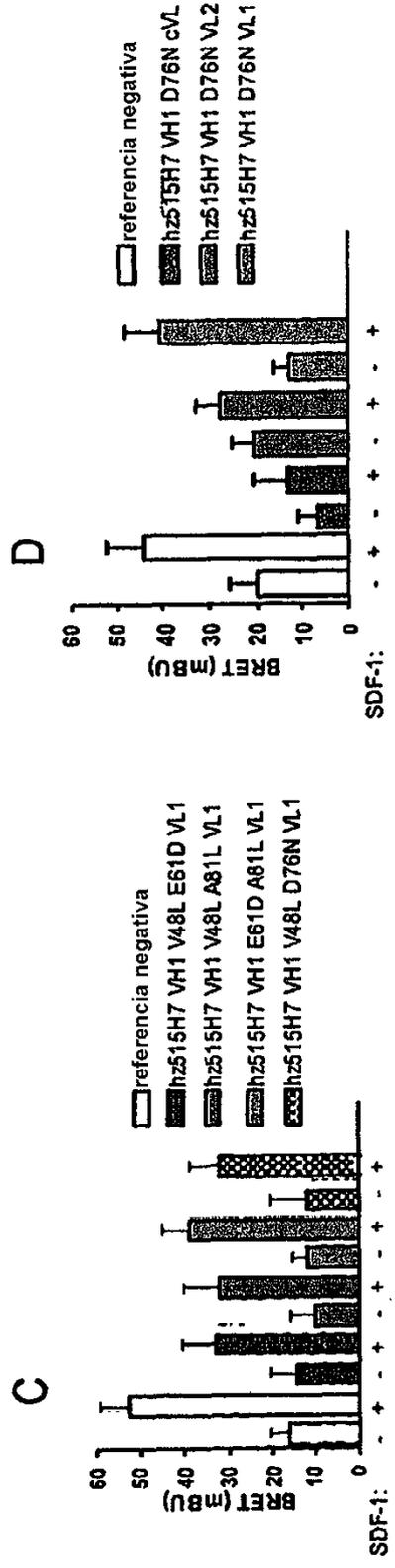


FIGURA 25A – FIGURA 25C

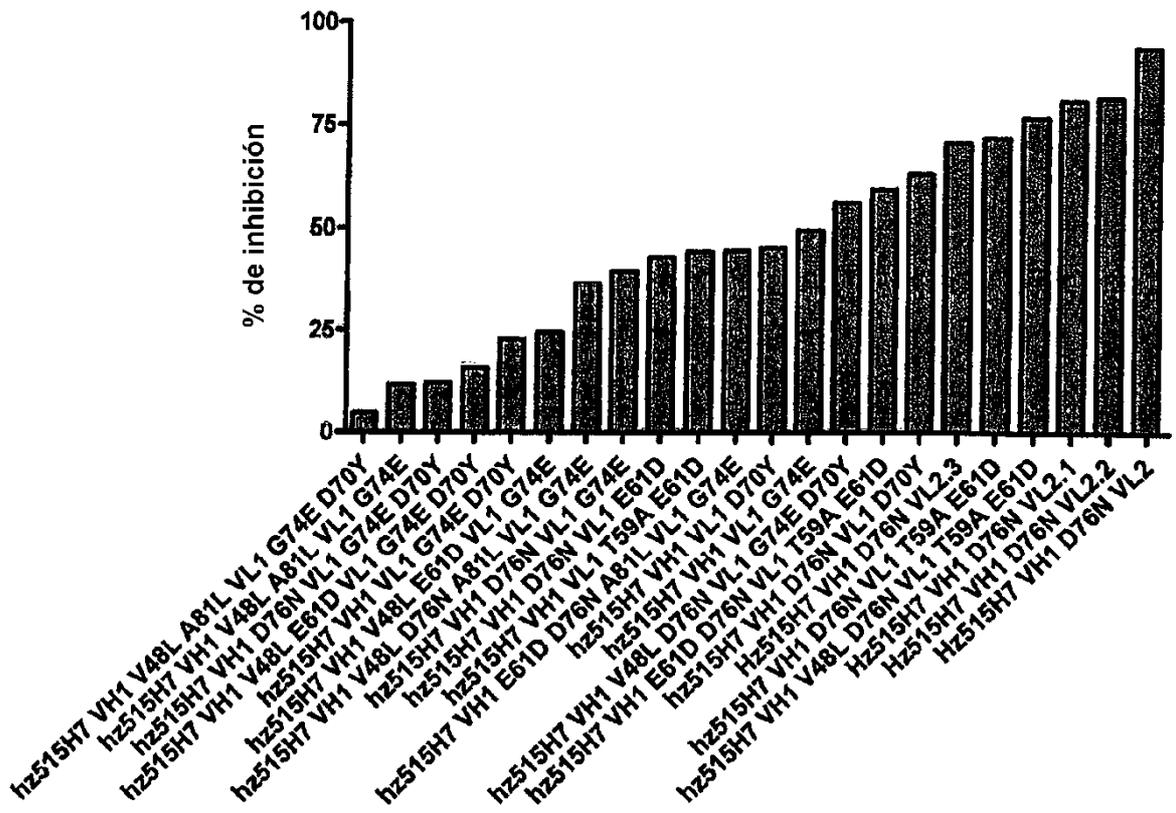


FIGURA 26

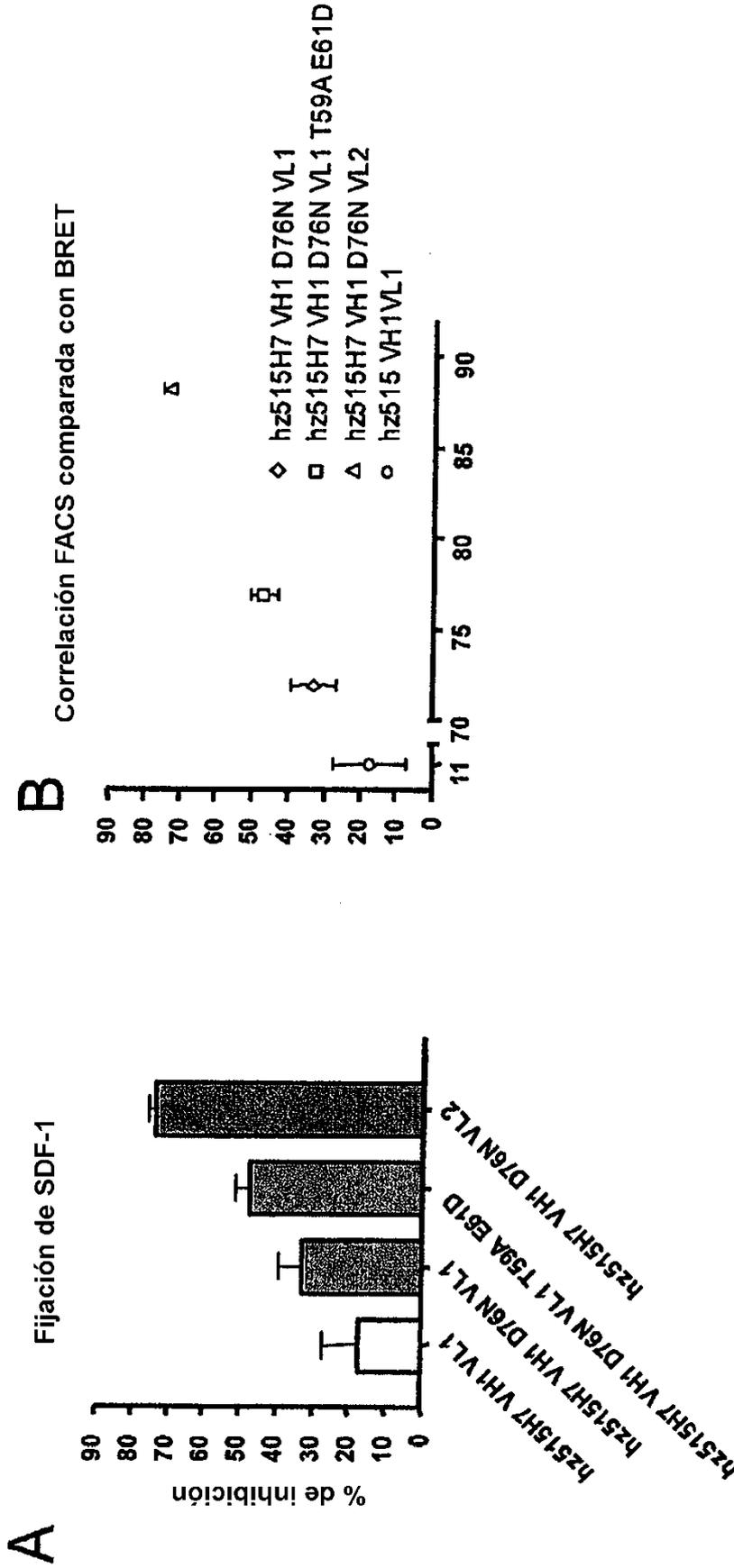


FIGURA 27A

FIGURA 27B

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL	
IGKV4-1*01	
VL2	
VL2.1	
VL2.2	
VL2.3	

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (106-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100				
515H7 VL
IGKV4-1*01
IGKJ1*01
WT
VL2
VL2.1
VL2.2
VL2.3

FIGURA 28

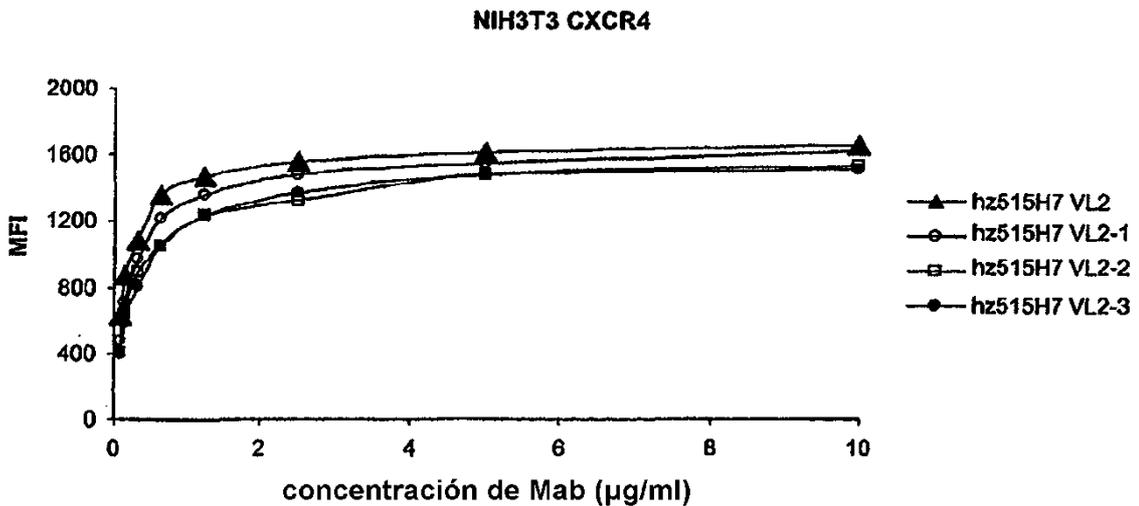


FIGURA 29A

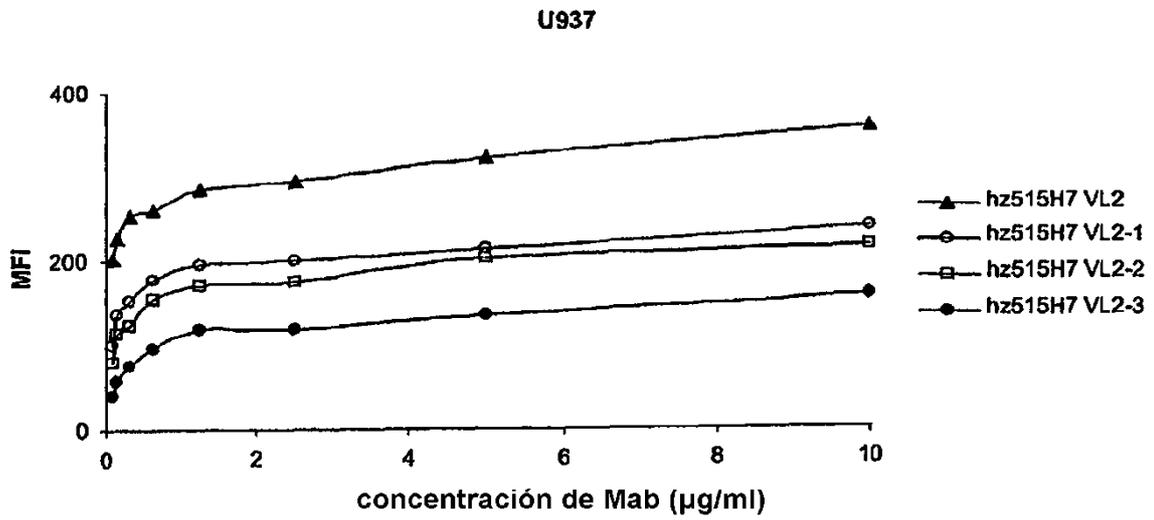


FIGURA 29B

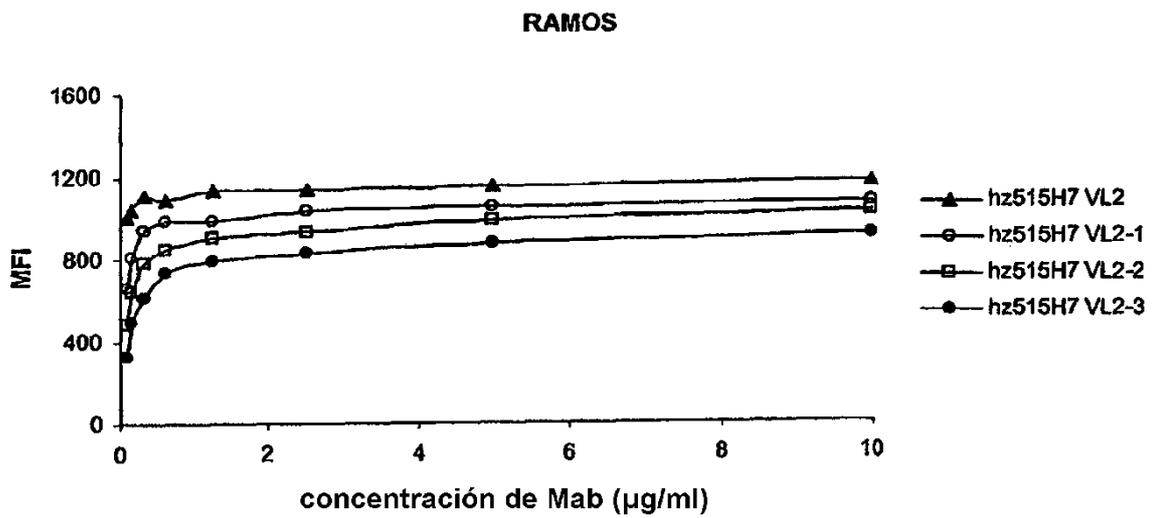


FIGURA 29C

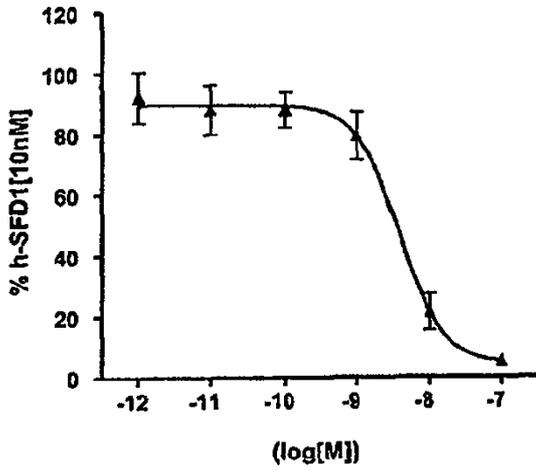


FIGURA 30A

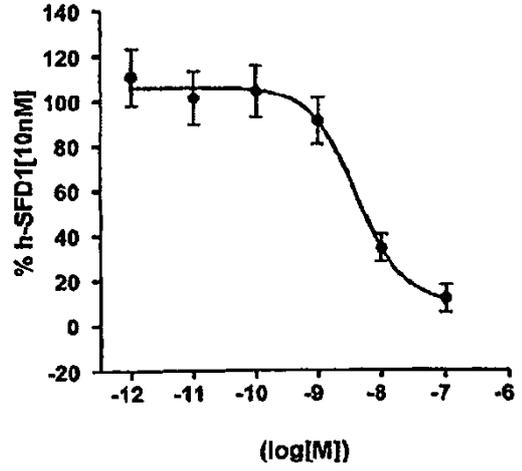


FIGURA 30B

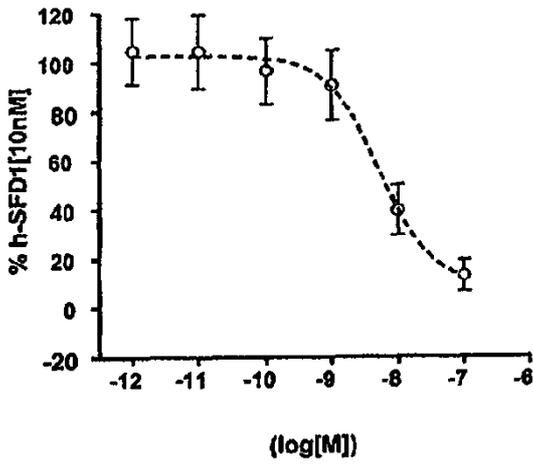


FIGURA 30C

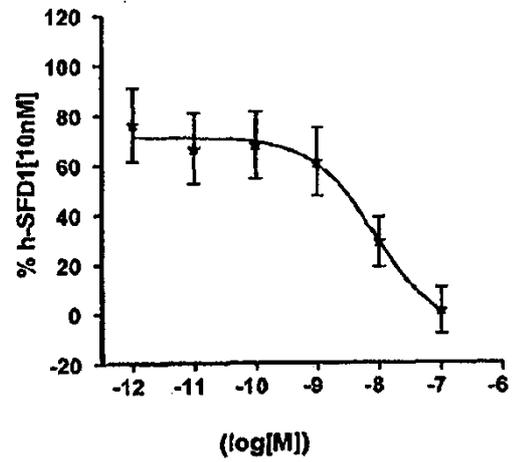


FIGURA 30D

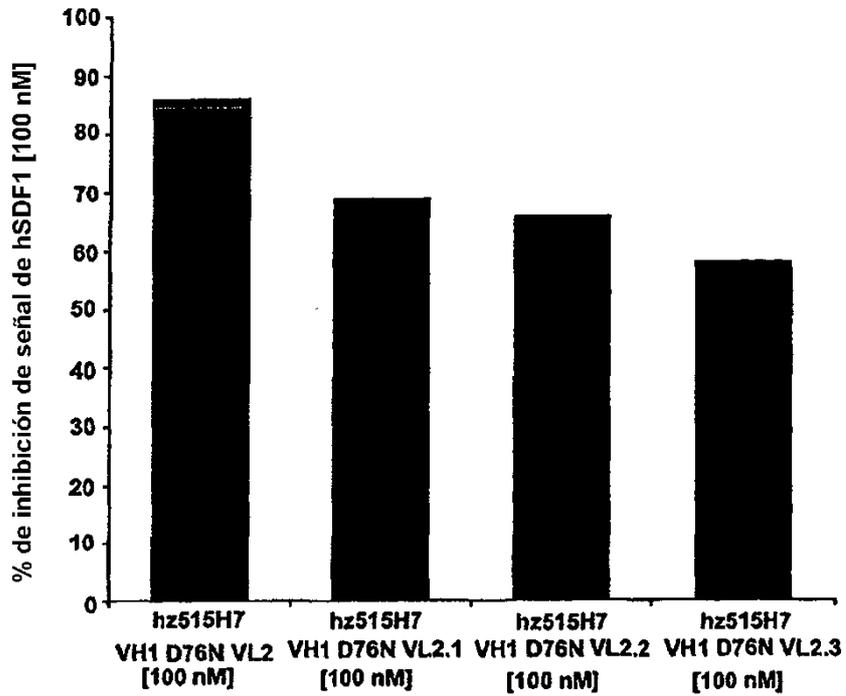


FIGURA 31

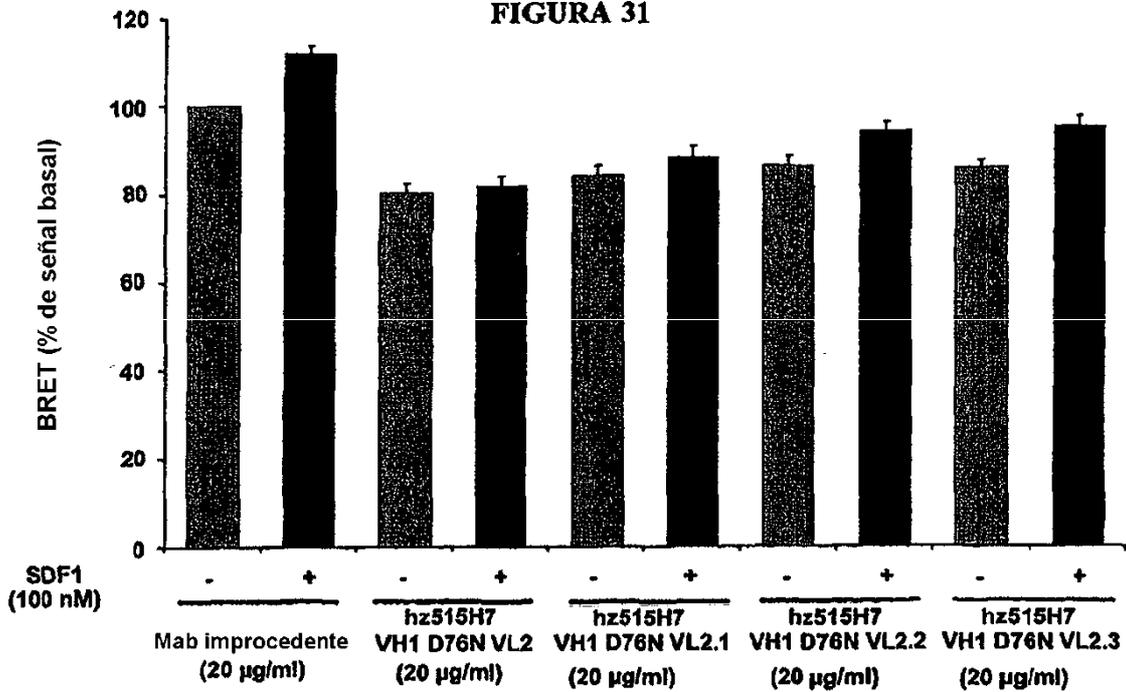


FIGURA 32A

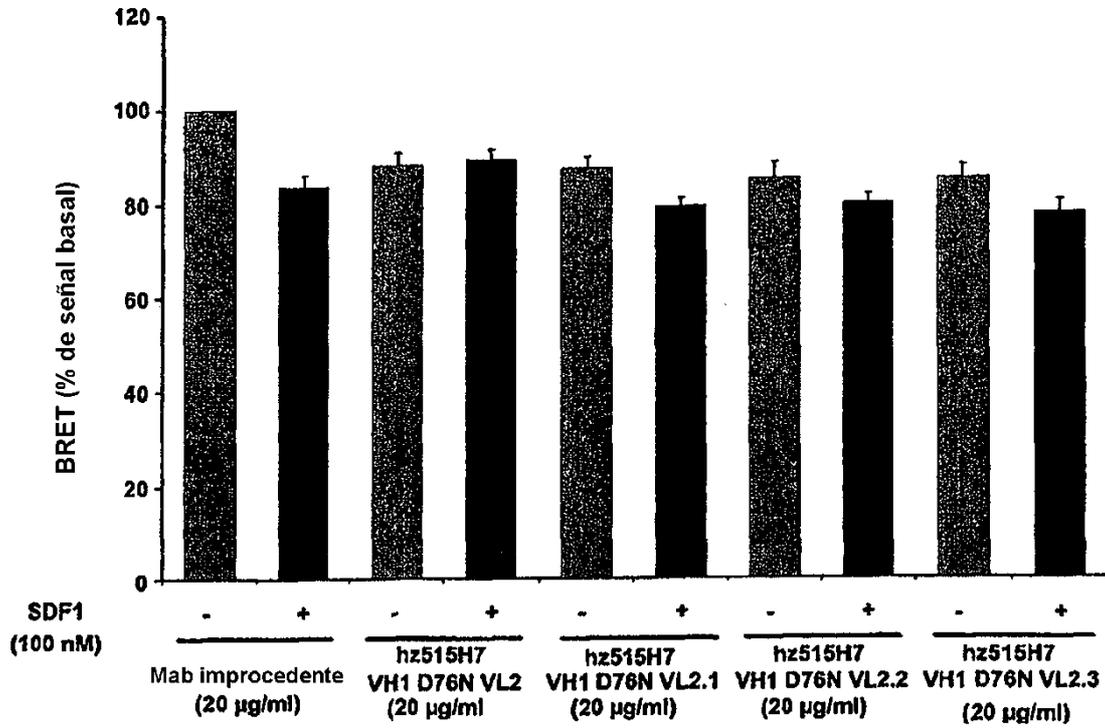


FIGURA 32B

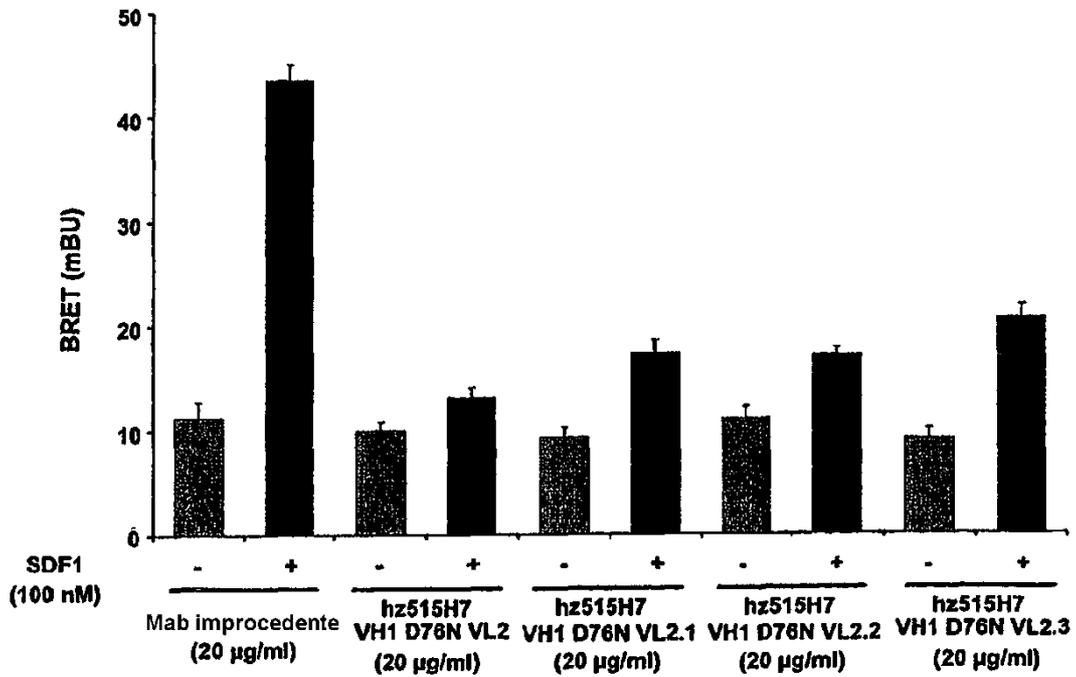


FIGURA 32C

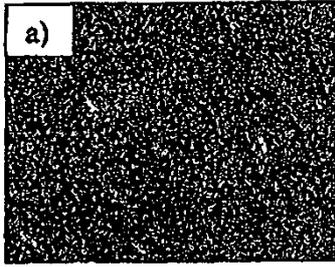


FIGURA 33A

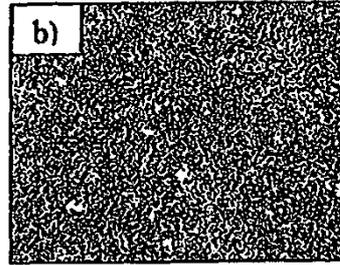


FIGURA 33B

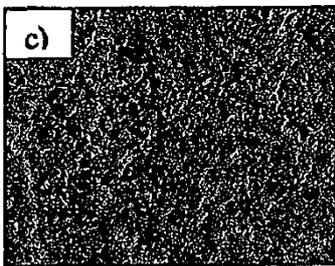


FIGURA 33C

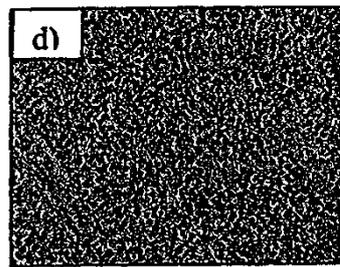


FIGURA 33D

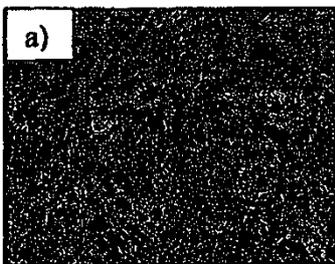


FIGURA 34A

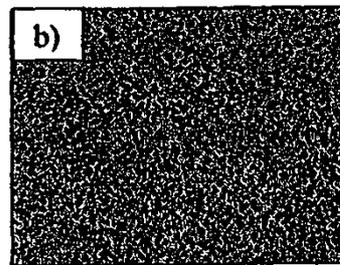


FIGURA 34B

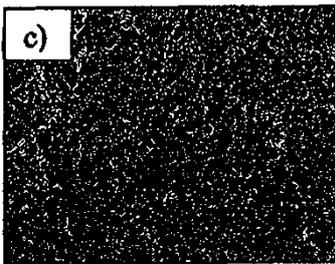


FIGURA 34C

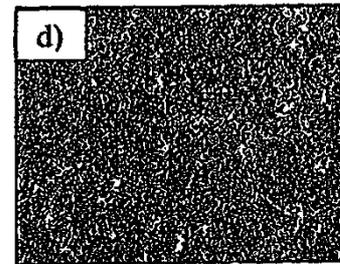


FIGURA 34D

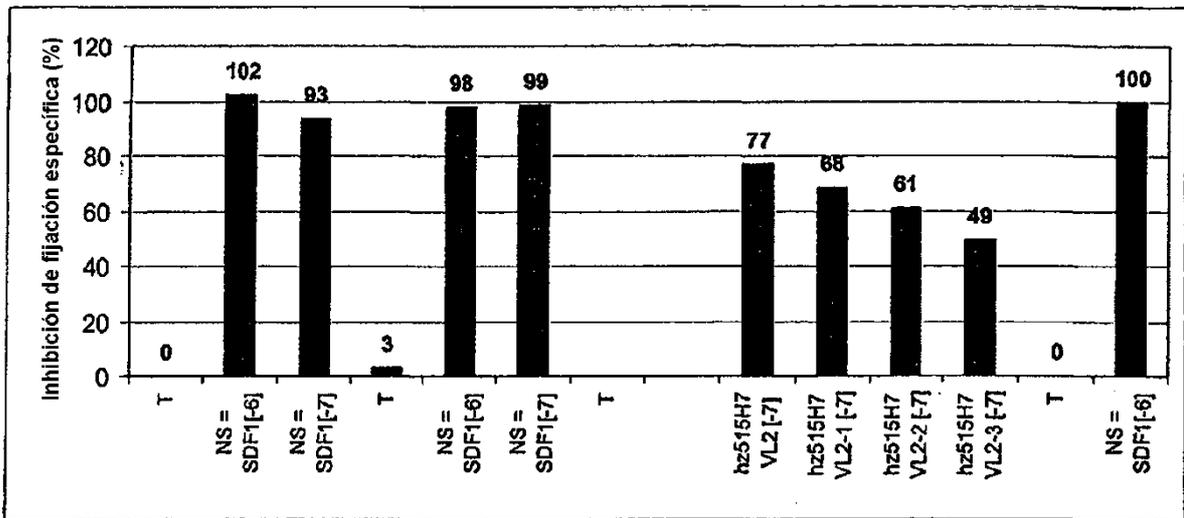


FIGURA 35A

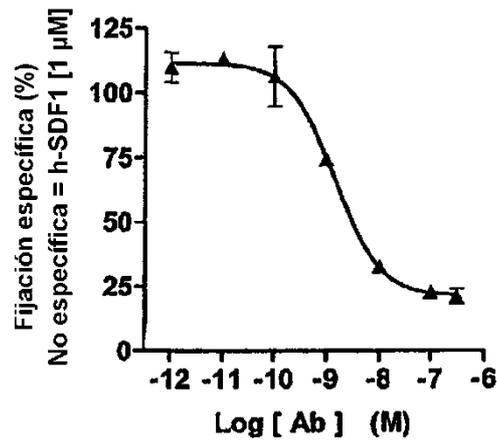


FIGURA 35B

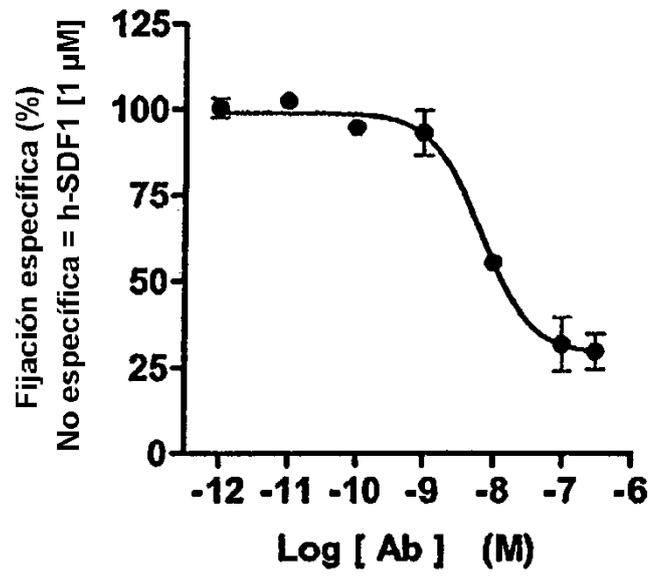


FIGURA 35C

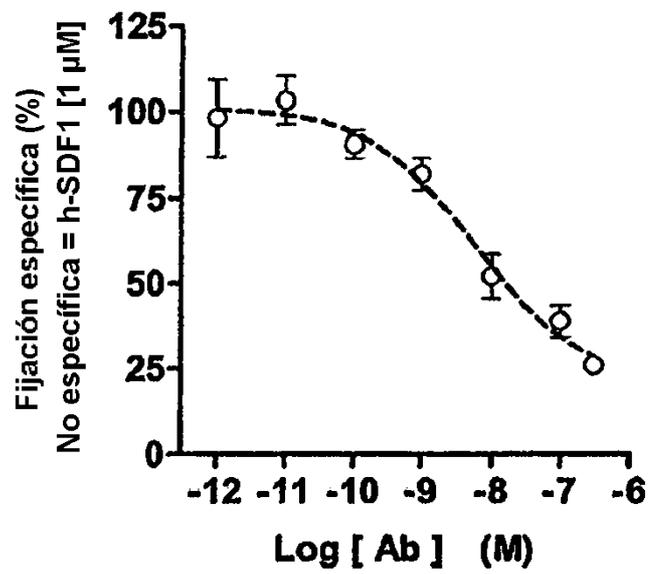


FIGURA 35D

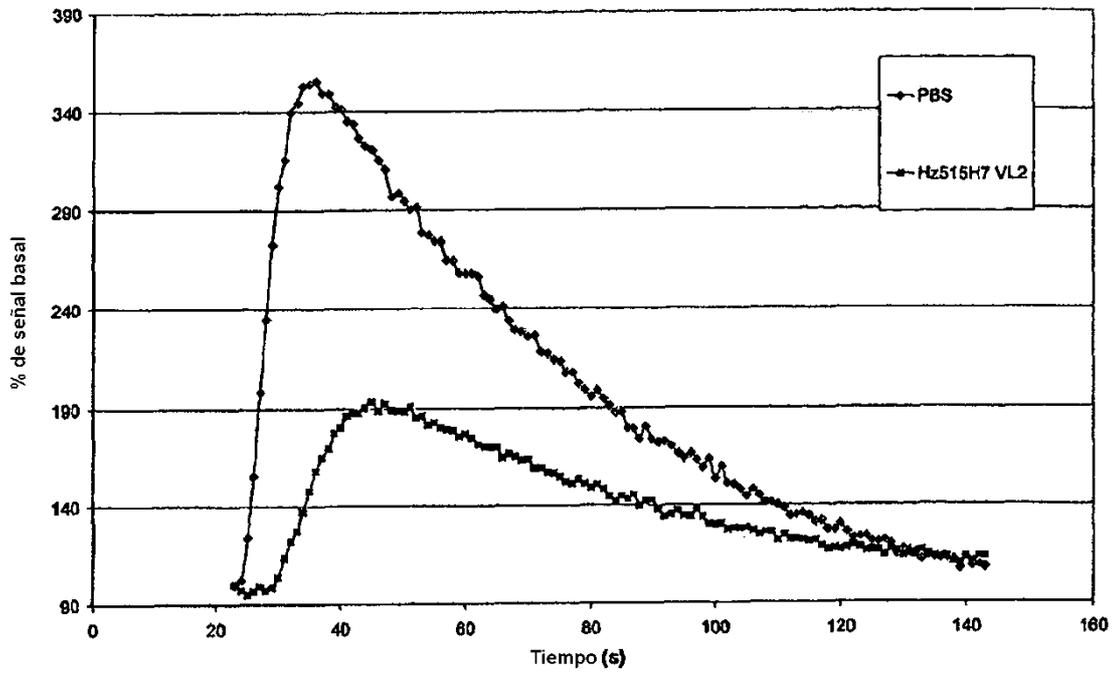


FIGURA 36

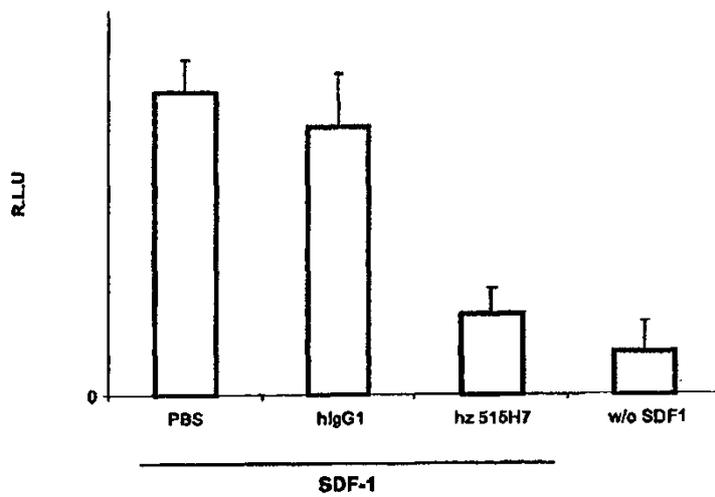


FIGURA 37A

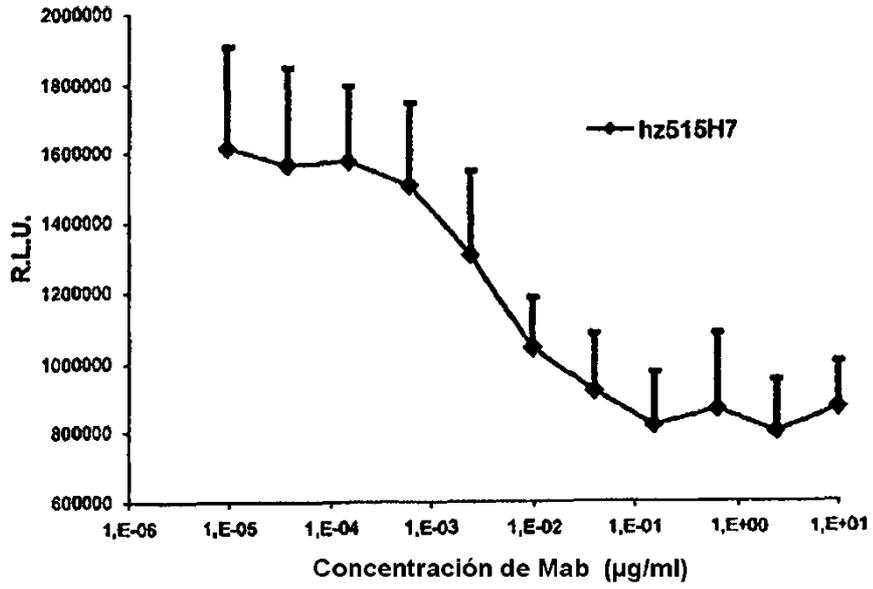


FIGURA 37B

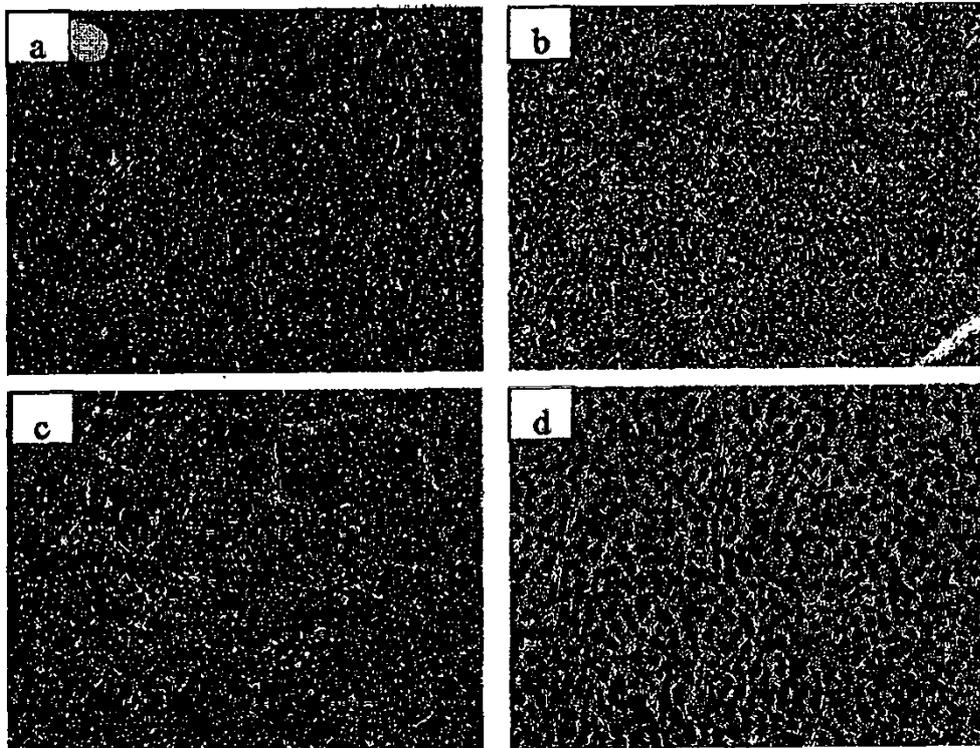


FIGURA 38

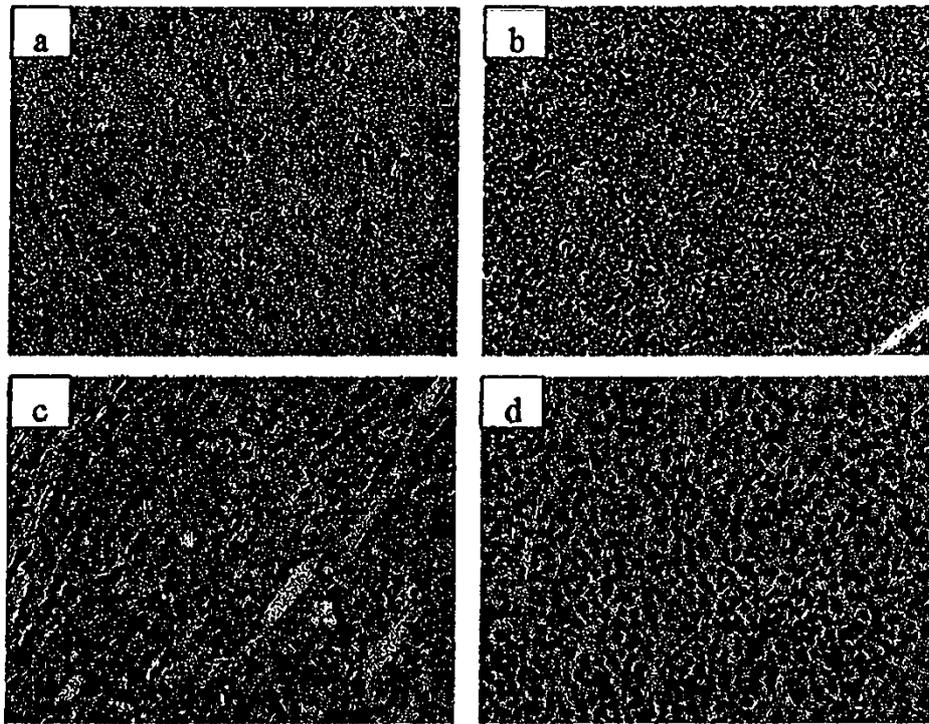


FIGURA 39

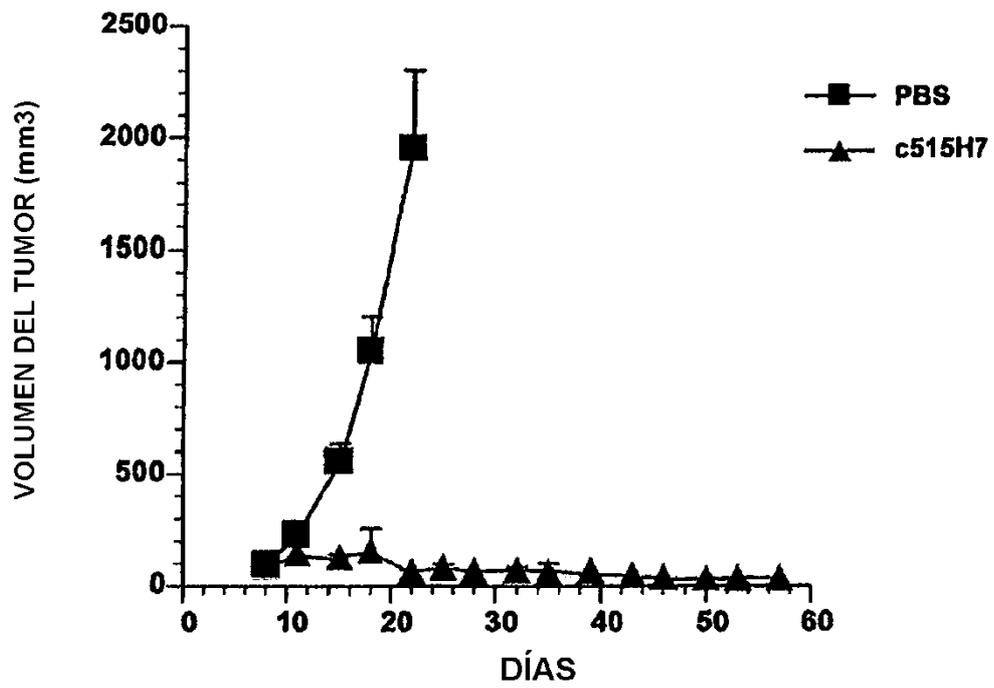


FIGURA 40

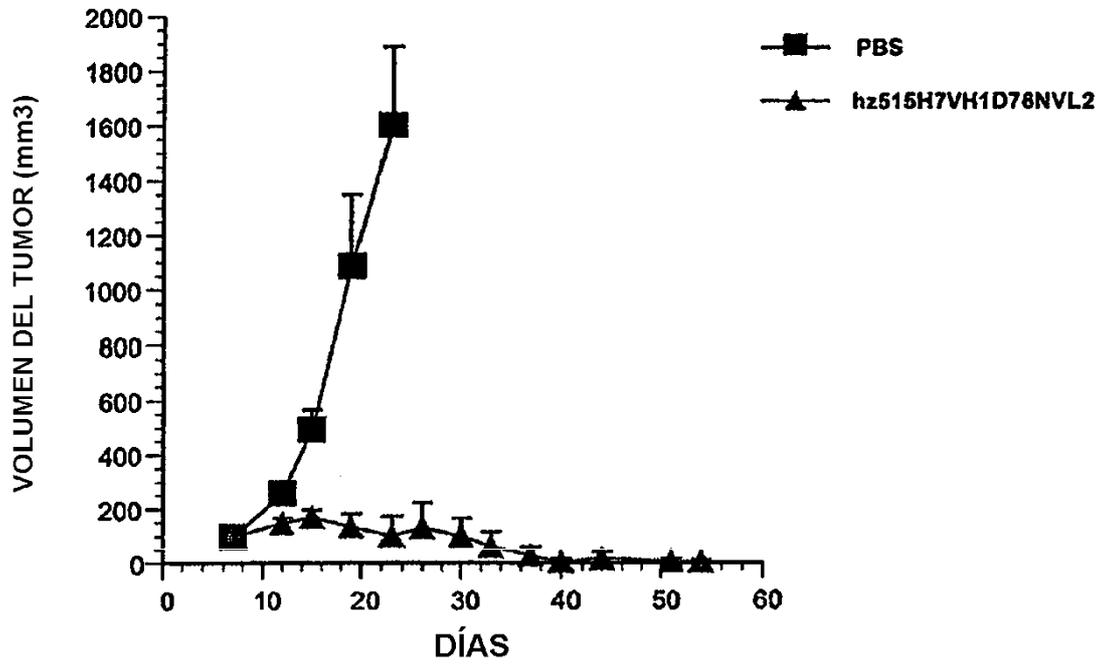


FIGURA 41

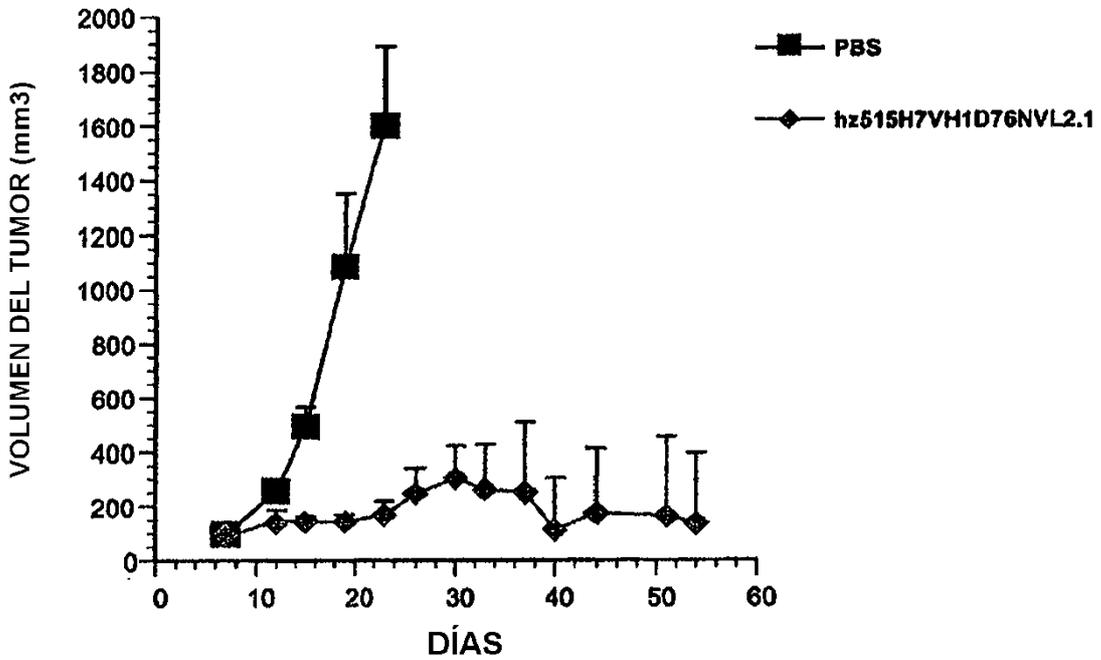


FIGURA 42