Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

BT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-37770

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS, DERIVADOS DE LOS MISMOA Y SU USO

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO PARIS, FRANCIA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

29-03-2010

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-037770- -00000-0000
Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII -Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **SANOFI-AVENTIS**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Francia.

Dirección: 174 Avenue de France,
75013 Paris,
Francia

Domicilio: Paris,
Francia

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Renata LEE**
8 Lucinda Court,
Edison,
New Jersey 08820,
Estados Unidos de América

2. **Vincent MIKOL**
48 Rue Gabrielle,
94220 Charenton-le-Pont,
Francia

3. **Elizabeth ALLEN**
1103 Monroe Drive,
Stewartsville,
New Jersey 08886,
Estados Unidos de América

4. **Norman RUETSCH**
35 Apple Orchard Road,
Moorestown,
New Jersey 08057,
Estados Unidos de América

5. **Beatrice CAMERON**
11 bis Rue Vauquelin,
75005 Paris,
Francia

6. **Thomas OLIGINO**
2422 Fringe Lane,
Forks Township,
Pennsylvania 18040,
Estados Unidos de América

7. **Nicolas BAURIN**
35 Rue De La Bretoniere,
91180 St. Germain Les Arpajon,
Francia

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/074381 Fecha: 27 de agosto de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/032661 A1 Fecha: 12 de marzo de 2009

6 Título (54)

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

7 Clasificación Internacional (51) A61K 039/395

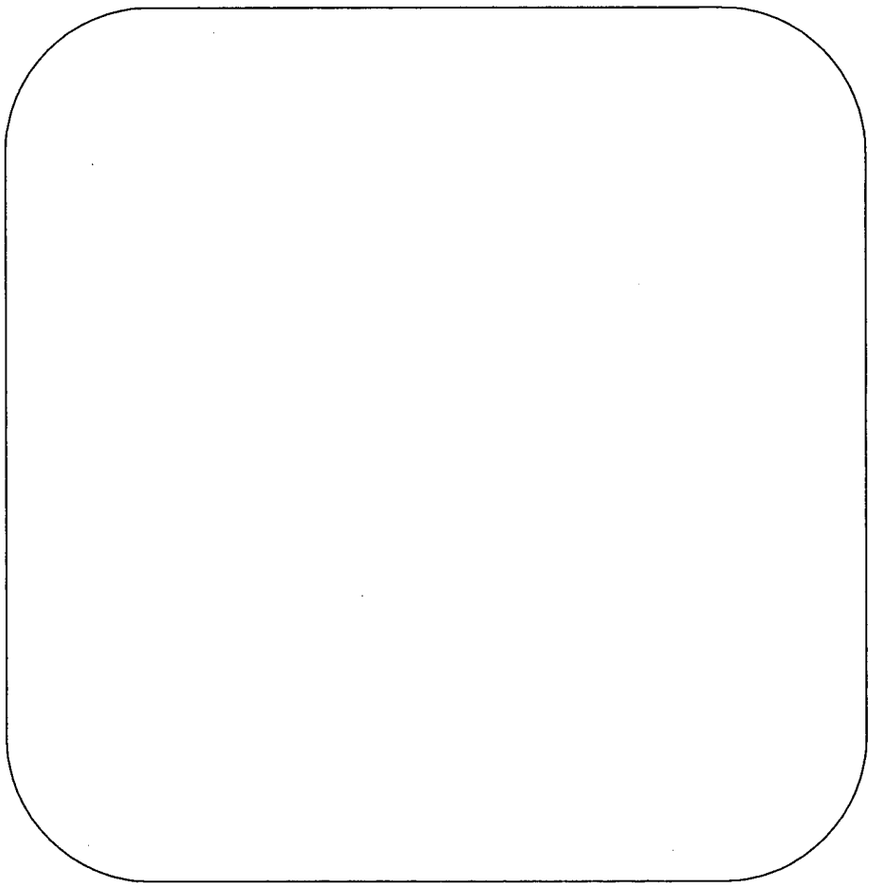
8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	29 de agosto de 2007	60/968,792

9 **Comprobante de pago No.:** 10- 177 **Fecha:** 5 de enero de 2010
10-18,571 9 de marzo de 2010
10-16,871 3 de marzo de 2010

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 15 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $390.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA**



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/032661 A1

   Descripción:

   Páginas 135 en el idioma original

   Páginas 121 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 25

   Figuras: Número (s)

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio en la dirección del inventor **Vincent MIKOL** y en el nombre de los inventores **Nicolas BAURIN** y **Norman RUETSCH.**

4. ☒ Listado de Secuencias.

5. ☒ Extracto de publicación.

6. ☒ Copia de la Resolución No. 15177 del 19 de marzo de 2010 por la cual se ordena suspender la atención al público de la Superintendencia de Industria y Comercio los días 29, 30 y 31 de marzo de 2010 y no contabilizar estos días en el cómputo de términos.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

5

REPUBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN NÚMERO 15177 DE 2010

Por la cual se ordena una suspensión de términos

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

En ejercicio de sus facultades legales, especialmente las conferidas por el artículo 3 del Decreto 3523 del 15 de septiembre de 2009, y,

CONSIDERANDO

PRIMERO. Que la Superintendencia de Industria y Comercio viene adelantando acciones de mejoramiento orientadas a lograr la desmaterialización de los documentos que se tramitan en la entidad permitiendo la optimización de los recursos y la disminución de tiempos requeridos para la atención de servicios y trámites. Los principales objetivos a cumplir en el marco de este proyecto son:

- Automatizar los procesos del Centro Documental (archivo físico de documentos)
- Mejorar la calidad del servicio que el Centro Documental presta al interior y exterior de la organización.
- Minimizar los riesgos de pérdida de documentos.
- Facilitar la conservación e integridad de los documentos evitando su manipulación.
- Permitir la consulta en línea de la información de los documentos y sus imágenes digitalizadas.
- Crear valijas virtuales tanto para los usuarios internos como externos.
- Optimizar el proceso de indexación de documentos de manera masiva, y la búsqueda de expedientes de acuerdo a sus índices.
- Agilizar el acceso y la consulta de los expedientes a los usuarios externos.

SEGUNDO. Que en esta etapa de implementación del proyecto y ante los niveles de documentos que administra la Superintendencia, se ha considerado que resulta indispensable minimizar el riesgo de deterioro o pérdida de folios que podría afectar la adecuada conformación de los expedientes que integran el archivo de la Entidad.

TERCERO. Que por lo anteriormente expuesto, se hace necesario realizar el inventario y la organización documental de expedientes de la Superintendencia, para continuar con la etapa de digitalización que se viene adelantando, mediante la suspensión de la circulación de expedientes, tanto entre las distintas dependencias como respecto de los usuarios externos de la entidad, durante el periodo que se establezca para ello.

CUARTO. Que el artículo 121 del Código de Procedimiento Civil aplicable a las actuaciones administrativas por remisión del artículo 267 del Código Contencioso Administrativo, establece: *"(...) En los términos de días no se tomarán en cuenta los de vacancia judicial,* ***ni aquellos en que por cualquier circunstancia permanezca cerrado el Despacho.***" (negrilla fuera de texto).

QUINTO. En virtud de lo previsto en la disposición citada, no se prestará servicio al público los días 29, 30 y 31 de marzo de 2010, los cuales a su vez no se tendrán en cuenta como días hábiles para el cómputo de términos, dentro de las diferentes actuaciones que se adelanten en la Superintendencia.

En mérito de lo expuesto este Despacho,

RESUELVE

ARTÍCULO PRIMERO: Suspender la atención al público de la Superintendencia de Industria y Comercio, durante los días 29, 30 y 31 de marzo de 2010.

ARTÍCULO SEGUNDO: No contabilizar los días 29, 30 y 31 de marzo de 2010 en el cómputo de los términos de días hábiles, respecto de las actuaciones administrativas y jurisdiccionales que se surten ante la Superintendencia de Industria y Comercio.

ARTÍCULO TERCERO: La presente resolución rige a partir de la fecha de su publicación.

PUBLÌQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C, a los diez y nueve (19) días del mes de marzo del 2010

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,

GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES

7

ME-43

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, D. COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

14475
2004

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
SANOFI-AVENTIS
domiciliado (s) en/of 174, avenue de France
F-75013 Paris, Francia, hereby ratify the patent application No. 05.057,645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Action[illegible] protection to the consumer, oppositions or [illegible] cancellation, nullity, infringement [illegible] mandamus, the protection of [illegible] and in general the civil [illegible] and administrative suits [illegible] instituted by me (us) or against me (us). And that in all the acts my [illegible] they may substitute this Pow[illegible]

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
23 FEB 2010
AMPARO QUINTERO TURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

8.

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____

en/in _____

por/by _____

Firma / Signature

Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

Vu pour certification matérielle de la signature de M. Markus Jacobi apposée ci-dessus.

PARIS

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
   Le présent acte public
2. - a été signé par Me KOENIG
3. - agissant en qualité de NOTAIRE
4. - est revêtu du sceau de Maître

ATTESTE

5. - à Paris le 21 JUIN 2005
7. - Par le Procureur Gal près la Cour d'Appel
8. - Sous N° 8102/2005
9. - Sceau

Le ... Signature

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

23 FEB. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS
WPPOOE01-179 (MINUTA 12.1 1.2.5)

K. L. ASSOCIÉS
Notaires
20, rue de la Paix
75002 PARIS
Tél. 01 55 04 70 00 - Fax 01 40 20 42 43

CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)

Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations Brevets Europe
De la société sanofi-aventis,
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français
que la société est sise174 avenue de France, 75013 PARIS, France
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris
Le 20/06/05

Le Notaire
(signature – cachet)

Alain KOENIG
NOTAIRE
28 rue de la Paix - 75002 PARIS Cedex 01

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays :
   Le présent acte public
2. a été signé par
3. agissant en qualité de
4. est revêtu du sceau/cachet de/du

Attesté

5. à
6. le
7. par
8. N°
9. Sceau/cachet :
10. Signature :

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
23 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
   Le présent acte public
2. - a été signé par Me KOENIG
3. - agissant en qualité de notaire
4. - est revêtu du sceau de Acte de l'Etat

ATTESTE

5. - à Paris le 21 JUIN 2005
7. - Par le Procureur Gal près la Cour d'Appel
8. - Sous N° 21203
9. - Sceau Le. Signature

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
23 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLES, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

LEGALIZACIONES

Escritas en FRANCES, al pie de un PODER escrito en ESPAÑOL, otorgado por **SANOFI- AVENTIS**, a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por EMILIO FERRERO el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)
Dr. Markus Jacobi
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.
(Firma Ilegible)
.L. ASSOCIES
Notarios
20, rue de la Paix
75002 PARIS

Sello del Notario

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
23 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)
El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente en

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario
(Firma – sello)

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 1448 DEL
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 1448 DEL
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

(Ilegible)
Alain Koenig
NOTARIO
20, rue de la Paix, París

APOSTILLA
(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Francesa

   El presente Documento Público

2. Fue firmado por el Abogado Koenig

3. Quien actúa en calidad de NOTARIO

4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

5. En París

6. El 21 de junio de 2005

7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia

8. Bajo el Número 81903

9. Sello/Estampilla:

   Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.

10- Firma: (Ilegible)

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA.
Traductora : María Eugenia Sanint
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 671 DEL
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 671 DEL
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
23 FEB. 2010
AMPARO QUINTERO ARTUR
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SAN[illegible]FE DE
[illegible]O BOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR
[illegible]A(S) PUESTA(S) POR
María Eugenia Sanín
[illegible] C.C. No.(s)
[illegible]
12 JUL 2005

NOTARIA SEXTA
[illegible]
Notario Sexto Encargado

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUL 12 P 1:28

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

4 4 9 2 4 3

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

23 FEB. 2010

AMPARO QUINTERO ARTUNDUAGA
NOTARIA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 March 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/032661 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/074381

(22) International Filing Date: 27 August 2008 (27.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/968,792 29 August 2007 (29.08.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SANOFI-AVENTIS** [FR/FR]; 174 Avenue De France, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **LEE, Renata** [US/US]; 8 Lucinda Court, Edison, NJ 08820 (US). **MIKOL, Vincent** [FR/FR]; 48 Rue Gabrielle, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). **ALLEN, Elizabeth** [US/US]; 1103 Monroe Drive, Stewartsville, NJ 08886 (US). **RUETSCH, Norman** [US/US]; 35 Apple Orchard Road, Moorestown, NJ 08057 (US). **CAMERON, Beatrice** [FR/FR]; 11 Bis Rue Vauquelin, F-75005 Paris (FR). **OLIGINO, Thomas** [US/US]; 2422 Fringe Lane, Forks Township, PA 18040 (US). **BAURIN, Nicolas** [FR/FR]; 35 Rue De La Bretoniere, F-91180 St. Germain Les Arpajon (FR).

(74) Agent: **NAKAMURA, Dean**; MDIP LLC, Post Office Box 2630, Montgomery Village, MD 20886-2630 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:
— *with international search report*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

WO 2009/032661 A1

(54) Title: HUMANIZED ANTI-CXCR5 ANTIBODIES, DERIVATIVES THEREOF AND THEIR USES

(57) Abstract: The present invention relates to humanized antibodies that specifically bind to CXCR5 and can, for example, inhibit CXCR5 function. The invention also includes uses of the antibodies to treat or prevent CXCR5 related diseases or disorders.

"HUMANIZED ANTI-CXCR5 ANTIBODIES, DERIVATIVES THEREOF AND THEIR USE"

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to anti-CXCR5 antibodies and their use in the amelioration, treatment or prevention of diseases or disorders in mammals, including humans, resulting from improper CXCR5 activity or metabolism, or the inappropriate or adventitious use thereof, for example, by a pathogen. An antibody of interest may block engagement of a ligand, such as CXCL13, with it receptor, such as, CXCR5. Prophylactic, immunotherapeutic and diagnostic compositions comprising the antibodies and derivatives thereof of interest and their use in methods for preventing or treating diseases in mammals, including humans, caused by inappropriate metabolism and/or activity of $CXCR5^+$ cells, such as B lymphocytes, also are disclosed. Such diseases include autoimmune deficiencies and diseases caused by or characterized by inflammation, such as rheumatoid arthritis (RA), where CXCR5 is up-regulated.

BACKGROUND

[0002] CXCR5, also known as Burkitt lymphoma receptor (BLR1), CD185, MDR15 and MGC117347, is a G protein-coupled receptor which is a member of the CXC chemokine receptor family. A ligand is BLC, also known as CXCL13, which is a B cell chemoattractant.

[0003] The unprocessed CXCR5 precursor is 372 amino acids in length with a molecular weight of 42 K_D.

[0004] CXCR5 has a role in B cell migration and localization within particular anatomic compartments. Knockout mice lack peripheral lymph nodes, have fewer Peyer's patches and have decreased B cell levels.

SUMMARY

[0005] The present invention provides novel humanized and human antibodies, and fragments and derivatives thereof, that specifically bind to CXCR5. Some of the antibodies, and CXCR5-binding fragments thereof, can be altered to prevent intrachain disulfide bond formation resulting in a molecule that is stable through manufacturing and use *in vivo*. Other antibodies of interest can be altered to minimize binding to F_cR. Some CXCR5 antibodies of interest compete with CXCL13 for binding to CXCR5. Other antibodies diminish CXCR5 activity.

[0006] The invention includes the amino acid sequences of the variable heavy and light chain of the antibodies and their corresponding nucleic acid sequences.

[0007] Another embodiment of the invention includes the complementarity determining regions (CDR) sequences of the antibodies to obtain binding molecules that comprise one or more CDR regions, or CDR-derived regions, that retain CXCR5-binding capacity of the parent molecule from which the CDR was(were) obtained.

[0008] An antibody of interest can be one that prevents CXCL13, or other ligand, binding to $CXCR5^+$ cells, such as B cells.

[0009] Another embodiment of the present invention includes the cell lines and vectors harboring the antibody sequences of the present invention.

[0010] Another embodiment of the present invention is the use of the antibodies for the preparation of a medicament or composition for the treatment of diseases and disorders associated with CXCR5 function and metabolism.

[0011] Another embodiment of the present invention is the use of these antibodies in the treatment of disorders associated with atypical or abnormal CXCR5 biology and function.

[0012] Additional features and advantages are described herein, and will be apparent from, the following Detailed Description.

DETAILED DESCRIPTION

[0013] This invention is not limited to the particular methodology, protocols, cell lines, vectors, or reagents described herein because they may vary without departing from the spirit and scope of the invention. Further, the terminology used herein is for the purpose of exemplifying particular embodiments only and is not intended to limit the scope of the present invention. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms and any acronyms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art in the field of the invention. Any method and material similar or equivalent to those described herein can be used in the practice of the present invention and only exemplary methods, devices, and materials are described herein.

[0014] All patents and publications mentioned herein are incorporated herein in entirety by reference for the purpose of describing and disclosing the proteins, enzymes, vectors, host cells and methodologies reported therein that might be used with and in the present invention. However, nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

[0015] Prior to teaching the making and using of the CXCR5-related methods and products of interest, the following non-limiting definitions of some terms and phrases are provided to guide the artisan.

[0016] "CXCR5" relates to the naturally occurring, known molecule found on lymphocytes, particularly B cells, and particularly naïve B cells; to such a molecule isolated from such cells; to such a molecule manufactured recombinantly using known materials and means, and using a nucleic acid encoding a CXCR5; as well as to portions of CXCR5, such as the extracellular (EC) domain, which retains the characteristics and properties relevant to the practice of the instant invention, such as CXCL13 binding. A soluble CXCR5 molecule can consist essentially of the EC

domain of CXCR5, which includes, generally, about the first sixty amino acids of the molecule, that is, the amino terminal portion of CXCR5.

[0017] CXCR5 is a non-promiscuous receptor. CXCL13 is a ligand of CXCR5 and is expressed constitutively on stromal cells, such as follicular dendritic cells, and in lymphoid tissues. CXCL13 specifically attracts B cells and a small subset of T cells called B helper follicular T cells, TFH. That may not be unexpected given the many interactions between T cell and B cell populations in the immune system. Moreover, activated T cell induces or upregulate CXCR5 expression. Infiltration of lymphocytes into tertiary, ectopic germinal centers (GCs) has been found to correlate well with increased disease severity and tolerance breakdown in certain disorders which preset with such atypical lymph node-like structures. Using *in vivo* murine models, such as CXCR5-/- and CXCL13-/- mice, the absence of either the receptor or the ligand results in an altered GC fine architecture due to altered T and B cell localization, and possibly interaction. These mice are also protected against developing severe collagen-induced arthritis (CIA). As CXCR5 is selectively expressed on mature B cells, which are linked to the pathogenesis of RA, blocking this receptor will modulate the arthritogenic response in affected individuals. Rheumatoid arthritis treatment with biologics (i.e., anti-TNFα and anti-CD20 antibodies, Rituximab) has shown to be clinically effective; in particular, patients on B cell-directed therapy have shown long-lasting improvements in clinical signs and symptoms. Selective targeting of CXCR5, which is only expressed on mature B cells and B helper T cells, will not affect B cell development or immunocompromise the patient. Unlike Rituximab, an instant antibody is a neutralizing antibody that does not mediate cell cytotoxicity.

[0018] A "CXCR5 disease" is a malady, disorder, disease, condition, abnormality and so on, which is characterized by or caused by overexpression or increased levels of CXCL13 or other CXCR5 ligand, increased levels of B cells, increased levels of B cell activity, increased levels of CXCR5 or improper metabolism and activity of CXCR5.

[0019] By "B cell activity" is meant higher than normal B cell levels, which can be local, or evidence of a biological manifestation or function of a B cell, such as antibody expression, Bruton's tyrosine kinase presence or activity, expression or presence of CD19, expression or presence of B cell activating factor and so on.

[0020] The phrase "substantially identical" with respect to an antibody chain polypeptide sequence may be construed as an antibody chain exhibiting at least 70%, 80%, 90%, 95% or more sequence identity to the reference polypeptide sequence. The term with respect to a nucleic acid sequence may be construed as a sequence of nucleotides exhibiting at least about 85%, 90%, 95%, 97% or more sequence identity to the reference nucleic acid sequence.

[0021] The terms, "identity" or "homology" may mean the percentage of nucleotide bases or amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residue of a corresponding sequence to which it is compared, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent identity for the entire sequence, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Neither N-terminal or C-terminal extensions nor insertions shall be construed as reducing identity or homology. Methods and computer programs for the alignment are available and well known in the art. Sequence identity may be measured using sequence analysis software.

[0022] The phrases and terms "functional fragment, variant, derivative or analog" and the like, as well as forms thereof, of an antibody or antigen is a compound or molecule having qualitative biological activity in common with a full-length antibody or antigen of interest. For example, a functional fragment or analog of an anti-CXCR5 antibody is one which can bind to a CXCR5 molecule or one which can prevent or substantially reduce the ability of a ligand, such as CXCL13, or an agonistic or antagonistic antibody, to bind to CXCR5. An example is an scF_V molecule. As to CXCR5, a variant or derivative thereof is a molecule that is not identical to a naturally occurring CXCR5 and yet can be used for a purpose of the instant invention, such as, while not identical to the wild type CXCR5 nevertheless

can be used as immunogen to raise antibodies that selectively bind to wild type CXCR5.

[0023] "Substitutional" variants are those that have at least one amino acid residue in a native sequence removed and replaced with a different amino acid inserted in its place at the same position. The substitutions may be single, where only one amino acid in the molecule is substituted, or may be multiple, where two or more amino acids are substituted in the same molecule. The plural substitutions may be at consecutive sites. Also, one amino acid can be replaced with plural residues, in which case such a variant comprises both a substitution and an insertion. "Insertional" variants are those with one or more amino acids inserted immediately adjacent to an amino acid at a particular position in a native sequence. Immediately adjacent to an amino acid means connected to either the α-carboxyl or α-amino functional group of the amino acid. "Deletional" variants are those with one or more amino acids in the native amino acid sequence removed. Ordinarily, deletional variants will have one or two amino acids deleted in a particular region of the molecule.

[0024] The term "antibody" is used in the broadest sense, and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), antibody fragments or synthetic polypeptides carrying one or more CDR or CDR-derived sequences so long as the polypeptides exhibit the desired biological activity. Antibodies (Abs) and immunoglobulins (Igs) are glycoproteins having the same structural characteristics. Generally, antibodies are considered Igs with a defined or recognized specificity. Thus, while antibodies exhibit binding specificity to a specific target, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules which lack target specificity. The antibodies of the invention can be of any class (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and so on), or subclass (e.g., IgG_1, IgG_2, IgG_{2a}, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2 and so on) ("type" and "class", and "subtype" and ""subclass", are used interchangeably herein). Native or wildtype, that is, obtained from a non-artificially manipulated member of a population, antibodies and immunoglobulins are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons,

composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at the other end. By "non-artificially manipulated" is meant not treated to contain or express a foreign antigen binding molecule. Wildtype can refer to the most prevalent allele or species found in a population or to the antibody obtained from a non-manipulated animal, as compared to an allele or polymorphism, or a variant or derivative obtained by a form of manipulation, such as mutagenesis, use of recombinant methods and so on to change an amino acid of the antigen-binding molecule.

[0025] As used herein, "anti-CXCR5 antibody" means an antibody or polypeptide derived therefrom (a derivative) which binds specifically to human CXCR5 as defined herein, including, but not limited to, molecules which inhibit or substantially reduce the binding of CXCR5 to its ligands or inhibit CXCR5 activity.

[0026] The term "variable" in the context of a variable domain of antibodies, refers to certain portions of the pertinent molecule which differ extensively in sequence between and among antibodies and are used in the specific recognition and binding of a particular antibody for its particular target. However, the variability is not evenly distributed through the variable domains of antibodies. The variability is concentrated in three segments called complementarity determining regions (CDRs; i.e., CDR1, CDR2, and CDR3) also known as hypervariable regions, both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR) regions or sequences. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β-sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β-sheet structure. The CDRs in each chain are held together often in proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the target (epitope or determinant) binding site of antibodies (see Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). As used herein,

numbering of immunoglobulin amino acid residues is done according to the immunoglobulin amino acid residue numbering system of Kabat et al., unless otherwise indicated. One CDR can carry the ability to bind specifically to the cognate epitope.

[0027] The term "antibody fragment" refers to a portion of an intact or a full-length chain or an antibody, generally the target binding or variable region. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ and F_v fragments. A "functional fragment" or "analog of an anti-CXCR5 antibody" is one which can prevent or substantially reduce the ability of the receptor to bind to a ligand or to initiate signaling. As used herein, functional fragment generally is synonymous with, "antibody fragment" and with respect to antibodies, can refer to fragments, such as F_v, F_{ab}, $F_{(ab')2}$ and so on which can prevent or substantially reduce the ability of the receptor to bind to a ligand or to initiate signaling. An "F_v" fragment consists of a dimer of one heavy and one light chain variable domain in a non-covalent association (V_H-V_L dimer). In that configuration, the three CDRs of each variable domain interact to define a target binding site on the surface of the V_H-V_L dimer, as in an intact antibody. Collectively, the six CDRs confer target binding specificity on the intact antibody. However, even a single variable domain (or half of an F_v comprising only three CDRs specific for a target) can have the ability to recognize and to bind target.

[0028] "Single-chain F_v," "sF_v" or "scAb" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the F_v polypeptide further comprises a polypeptide linker, often a flexible molecule, between the V_H and V_L domains, which enables the sFv to form the desired structure for target binding.

[0029] The term "diabodies" refers to antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments can comprise a heavy chain variable domain (V_H) connected to a light chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain. By using a linker that is too short to allow pairing between the two variable domains

on the same chain, the diabody domains are forced to pair with the binding domains of another chain to create two antigen-binding sites.

[0030] The F_{ab} fragment contains the variable and constant domains of the light chain and the variable and first constant domain (C_{H1}) of the heavy chain. $F_{ab'}$ fragments differ from F_{ab} fragments by the addition of a few residues at the carboxyl terminus of the C_{H1} domain to include one or more cysteines from the antibody hinge region. $F_{ab'}$ fragments can be produced by cleavage of the disulfide bond at the hinge cysteines of the $F_{(ab')2}$ pepsin digestion product. Additional enzymatic and chemical treatments of antibodies can yield other functional fragments of interest.

[0031] The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts.

[0032] Monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass (type or subtype), with the remainder of the chain(s) identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity of binding to CXCR5 or impacting CXCR5 activity or metabolism (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). Thus, CDRs from one class of antibody can be grafted into the FR of an antibody of different class or subclass.

[0033] Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single target site, epitope or determinant. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes) of an antigen, each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the target. In addition to their specificity, monoclonal antibodies are advantageous being synthesized by a host cell,

uncontaminated by other immunoglobulins, and provides for cloning the relevant gene and mRNA encoding the antibody of chains thereof. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies for use with the present invention may be isolated from phage antibody libraries using well known techniques or can be purified from a polyclonal prep. The parent monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method described by Kohler et al., Nature 256:495 (1975), or may be made by recombinant methods well known in the art.

[0034] "Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as F_v, F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ or other target-binding subsequences of antibodies) which contain sequences derived from non-human immunoglobulin, as compared to a human antibody. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin template sequence. The humanized antibody may also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (F_c), typically that of the human immunoglobulin template chosen. In general, the goal is to have an antibody molecule that is minimally immunogenic in a human. Thus, it is possible that one or more amino acids in one or more CDRs also can be changed to one that is less immunogenic to a human host, without substantially minimizing the specific binding function of the one or more CDRs to CXCR5 or to CXCL13. Alternatively, the FR can be non-human but those amino acids most immunogenic are replaced with ones less immunogenic. Nevertheless, CDR grafting, as discussed above, is not the only way to obtain a humanized antibody. For example, modifying just the CDR regions may be insufficient as it is not uncommon for framework residues to have a role in determining the three-dimensional structure of the CDR loops and the overall affinity of the antibody for its ligand. Hence, any

[0035] The adaptive immune response has two major arms: the cellular immune response of T lymphocytes and the humoral immune response of antibody secreting B lymphocytes. B cell epitopes can be linear, contiguous amino acids, or can be conformational (Protein Science (2005) 14, 246). In contrast, T-cell epitopes are short linear peptides that are cleaved from antigenic proteins that are presented in the context of major histocompatibility complex (MHC) proteins, or, in case of humans, human leukocyte antigen (HLA) class I or class II molecules. Epitope presentation depends on both MHC-peptide binding and T cell receptor (TCR) interactions. MHC proteins are highly polymorphic, and each binds to a limited set of peptides. Thus, the particular combination of MHC alleles present in a host limits the range of potential epitopes recognized during an infection.

[0036] Two fundamental types of T cells are distinguished by expression of CD8 and CD4 proteins, which dictate whether a T cell will recognize epitopes presented by class I or class II molecules, respectively. $CD4^+$ T epitopes are processed after encapsulation by antigen presenting cells in membrane bound vesicles, where the antigen is degraded by proteases into peptide fragments that bind to MHC class II proteins. In contrast, $CD8^+$ T cells generally recognize viral or self-antigens

expressed from within a cell, proteins that are cleaved into short peptides in the cytosol by the immunoproteasome. After cleavage, peptides are translocated by the transporter associated with antigen processing (TAP) into the endoplasmic reticulum for loading onto HLA I antigens. $CD4^+$ T (helper) cell epitopes are critical in driving T cell-dependent immune responses to protein antigens.

[0037] A humanization method of interest is based on the impact of the molecular flexibility of the antibody during and at immune recognition. Protein flexibility is related to the molecular motion of the protein molecule. Protein flexibility is the ability of a whole protein, a part of a protein or a single amino acid residue to adopt an ensemble of conformations which differ significantly from each other. Information about protein flexibility can be obtained by performing protein X-ray crystallography experiments (see, for example, Kundu et al. 2002, Biophys J 83:723–732.), nuclear magnetic resonance experiments (see, for example, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) or by running molecular dynamics (MD) simulations. An MD simulation of a protein is done on a computer and allows one to determine the motion of all protein atoms over a period of time by calculating the physical interactions of the atoms with each other. The output of a MD simulation is the trajectory of the studied protein over the period of time of the simulation. The trajectory is an ensemble of protein conformations, also called snapshots, which are periodically sampled over the period of the simulation, e.g. every 1 picosecond (ps). It is by analyzing the ensemble of snapshots that one can quantify the flexibility of the protein amino acid residues. Thus, a flexible residue is one which adopts an ensemble of different conformations in the context of the polypeptide within which that residue resides. MD methods are known in the art, see, e.g., Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Several software enable MD simulations, such as Amber (see Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (see Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; and MacKerell et al. (1998) in "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) or Impact (see Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

[0038] Most protein complexes share a relatively large and planar buried surface and it has been shown that flexibility of binding partners provides the origin for their plasticity, enabling them to conformationally adapt to each other (Structure (2000) 8, R137-R142). As such, examples of "induced fit" have been shown to play a dominant role in protein-protein interfaces. In addition, there is a steadily increasing body of data showing that proteins actually bind ligands of diverse shapes sizes and composition (Protein Science (2002) 11:184-187) and that the conformational diversity appears to be an essential component of the ability to recognize different partners (Science (2003) 299, 1362-1367). Flexible residues are involved in the binding of protein-protein partners (Structure (2006) 14, 683-693).

[0039] The flexible residues can adopt a variety of conformations that provide an ensemble of interaction areas that are likely to be recognized by memory B cells and to trigger an immunogenic response. Thus, antibody can be humanized by modifying a number of residues from the framework so that the ensemble of conformations and of recognition areas displayed by the modified antibody resemble as much as possible those adopted by a human antibody.

[0040] That can be achieved by modifying a limited number of residues by: (1) building a homology model of the parent mAb and running an MD simulation; (2) analyzing the flexible residues and identification of the most flexible residues of a non-human antibody molecule, as well as identifying residues or motifs likely to be a source of heterogeneity or of degradation reaction; (3) identifying a human antibody which displays the most similar ensemble of recognition areas as the parent antibody; (4) determining the flexible residues to be mutated, residues or motifs likely to be a source of heterogeneity and degradation are also mutated; and (5) checking for the presence of known T cell or B cell epitopes. The flexible residues can be found using an MD calculation as taught herein using an implicit solvent model, which accounts for the interaction of the water solvent with the protein atoms over the period of time of the simulation.

[0041] Once the set of flexible residues has been identified within the variable light and heavy chains, a set of human heavy and light chain variable region

frameworks that closely resemble that of the antibody of interest are identified. That can be done, for example, using a blast search on the set of flexible residues against a database of antibody human germ line sequence. It can also be done by comparing the dynamics of the parent mAb with the dynamics of a library of germ line canonical structures. The CDR residues and neighboring residues are excluded from the search to ensure high affinity for the antigen is preserved.

[0042] Thus, a comparison the molecular dynamic trajectory of the antibody of interest with the trajectories of a library of germ line antibody structures was conducted. 16D7 was compared to a library of 49 germ line structures. The molecular dynamic trajectory retained of each antibody is an ensemble of molecular dynamic calculations during the molecular dynamics computer simulation where, for example, about 10 diverse conformations are used as diverse starting points, and for each starting point, about 10 molecular dynamic simulations are run. The 49 3D homology models of the human antibody germ lines were built by systematically combining the 7 most frequent human light chain (vκ1, vκ2, vκ3, vκ4, vλ1, vlλ2 and vλ3) and the 7 most frequent heavy chains (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5 and vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597). The flexible residues of 16D7 are then changed to the corresponding residues of the germ line structure with a trajectory closest to that of the antibody of interest.

[0043] Flexible residues then are replaced. When several human residues show similar homologies, the selection is driven also by the nature of the residues that are likely to affect the solution behavior of the humanized antibody. For instance, polar residues will be preferred in exposed flexible loops over hydrophobic residues. Residues which are a potential source of instability and heterogeneity are also mutated even if there are found in the CDRs. That will include exposed methionines as sulfoxide formation can result from oxygen radicals, proteolytic cleavage of acid labile bonds such as those of the Asp-Pro dipeptide (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), deamidation sites found with an exposed asparagine residue followed by a small amino acid, such as Gly, Ser, Ala, His, Asn or Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43) and N-glycosylation sites, such as the Asn-X-Ser/Thr site. Typically,

exposed methionines will be substituted by a Leu, exposed asparagines will be replaced by a glutamine or by an aspartate, or the subsequent residue will be changed. For the glycosylation site (Asn-X-Ser/Thr), either the Asn or the Ser/Thr residue will be changed.

[0044] The resulting composite sequence is checked for the presence of known B cell or linear T-cell epitopes. A search is performed, for example, with the publicly available Immune Epitope Data Base (IEDB) (PLos Biol (2005) 3(3)e91). If a known epitope is found within the composite sequence, another set of human sequences is retrieved and substituted

[0045] Unlike the resurfacing method of US Pat. No. 5,639,641, both B-cell-mediated and T-cell-mediated immunogenic responses are addressed by the method. The method also avoids the issue of loss of activity that is sometimes observed with CDR grafting (US Pat. No. 5,530,101). In addition, stability and solubility issues also are considered in the engineering and selection process, resulting in an antibody that is optimized for low immunogenicity, high antigen affinity and improved biophysical properties.

[0046] Strategies and methods for resurfacing antibodies, and other methods for reducing immunogenicity of antibodies within a different host, are disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 5,639,641. Briefly, in a preferred method, (1) position alignments of a pool of antibody heavy and light chain variable regions are generated to yield heavy and light chain variable region framework surface exposed positions, wherein the alignment positions for all variable regions are at least about 98% identical; (2) a set of heavy and light chain variable region framework surface exposed amino acid residues is defined for a non-human, such as a rodent antibody (or fragment thereof); (3) a set of heavy and light chain variable region framework surface exposed amino acid residues that is most closely identical to the set of rodent surface exposed amino acid residues is identified; and (4) the set of heavy and light chain variable region framework surface exposed amino acid residues defined in step (2) is substituted with the set of heavy and light chain variable region framework surface exposed amino acid residues identified in step (3), except for those amino acid

residues that are within 5Å of any atom of any residue of a CDR of the rodent antibody, to yield a humanized, such as a rodent antibody retaining binding specificity.

[0047] Antibodies can be humanized by a variety of other techniques including CDR grafting (EPO 0 239 400; WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 5,530,101 and 5,585,089), veneering or resurfacing (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; and Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) and chain shuffling (U.S. Pat. No. 5,565,332). Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including, but not limited to, phage display methods, see U.S. Pat. Nos. 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 and 5,814,318; and WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 and WO 91/10741, using transgenic animals, such as rodents, using chimeric cells and so on.

[0048] "Antibody homolog" or "homolog" refers to any molecule which specifically binds CXCR5 as taught herein. Thus, an antibody homolog includes native or recombinant antibody, whether modified or not, portions of antibodies that retain the biological properties of interest, such as binding CXCR5, such as an F_{ab} or F_v molecule, a single chain antibody, a polypeptide carrying one or more CDR regions and so on. The amino acid sequence of the homolog need not be identical to that of the naturally occurring antibody but can be altered or modified to carry substitute amino acids, inserted amino acids, deleted amino acids, amino acids other than the twenty normally found in proteins and so on to obtain a polypeptide with enhanced or other beneficial properties.

[0049] Antibodies with homologous sequences are those antibodies with amino acid sequences that have sequence homology with the amino acid sequence of a CXCR5 antibody of the present invention. Preferably, homology is with the amino acid sequence of the variable regions of an antibody of the present invention. "Sequence homology" as applied to an amino acid sequence herein is defined as a sequence with at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94% or more sequence homology, and more preferably at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence homology

to another amino acid sequence, as determined, for example, by the FASTA search method in accordance with Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988).

[0050] A chimeric antibody is one with different portions of an antibody derived from different sources, such as different antibodies, different classes of antibody, different animal species, for example, an antibody having a variable region derived from a murine monoclonal antibody paired with a human immunoglobulin constant region and so on. Thus, a humanized antibody is a species of chimeric antibody. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art, see, e.g., Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202; and U.S. Pat. Nos. 5,807,715, 4,816,567, and 4,816,397.

[0051] Artificial antibodies include single chain antibodies, scFv fragments, chimeric antibodies, diabodies, triabodies, tetrabodies and mru (see reviews by Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293-299; and Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11:548-557), each with antigen-binding or epitope-binding ability. In the single chain F_v fragment (scF_v), the V_H and V_L domains of an antibody are linked by a flexible peptide. Typically, the linker is a peptide of about 15 amino acids. If the linker is much smaller, for example, 5 amino acids, diabodies are formed, which are bivalent scFv dimers. If the linker is reduced to less than three amino acid residues, trimeric and tetrameric structures are formed that are called triabodies and tetrabodies, respectively. The smallest binding unit of an antibody can be a single CDR, typically the CDR2 or 3 of the heavy chain which has sufficient specific recognition and binding capacity, but can be any combination of CDR sequences as can be determined practicing the methods taught herein. Such a fragment is called a molecular recognition unit or mru. Several such mrus can be linked together with short linker peptides, therefore forming an artificial binding protein with higher avidity than a single mru.

[0052] Also included within the scope of the invention are functional equivalents of an antibody of interest. The term "functional equivalents" includes

[0053] The functional equivalents of the present application also include modified antibodies, e.g., antibodies modified by the covalent attachment of any type of molecule to the antibody. For example, modified antibodies include antibodies that have been modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, deamidation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand, linkage to a toxin or cytotoxic moiety or other protein etc. The covalent attachment need not yield an antibody that is immune from generating an anti-idiotypic response. The modifications may be achieved by known techniques, including, but not limited to, specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis etc. Additionally, the modified antibodies may contain one or more non-classical amino acids.

[0054] Many techniques are available to one of ordinary skill in the art which permit the optimization of binding affinity. Typically, the techniques involve substitution of various amino acid residues at the site of interest, followed by a screening analysis of binding affinity of the mutant polypeptide for the cognate antigen or epitope.

[0055] Once the antibody is identified and isolated, it is often useful to generate a variant antibody or mutant, or mutein, wherein one or more amino acid residues are altered, for example, in one or more of the hypervariable regions of the antibody. Alternatively, or in addition, one or more alterations (e.g., substitutions) of

framework residues may be introduced in the antibody where these result in an improvement in the binding affinity of the antibody mutant for CXCR5. Examples of framework region residues that can be modified include those which non-covalently bind antigen directly (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); interact with/affect the conformation of a CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); and/or participate in the V_L-V_H interface (EP 239 400). In certain embodiments, modification of one or more of such framework region residues results in an enhancement of the binding affinity of the antibody for the cognate antigen. For example, from about one to about five framework residues may be altered in this embodiment of the invention. Sometimes, this may be sufficient to yield an antibody mutant suitable for use in preclinical trials, even where none of the hypervariable region residues have been altered. Normally, however, the antibody mutant can comprise one or more hypervariable region alteration(s). The constant regions also can be altered to obtain desirable or more desirable effector properties.

[0056] The hypervariable region residues which are altered may be changed randomly, especially where the starting binding affinity of the parent antibody is such that randomly-produced antibody mutants can be readily screened for altered binding in an assay as taught herein.

[0057] One procedure for obtaining antibody mutants, such as CDR mutants, is "alanine scanning mutagenesis" (Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989); and Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). One or more of the hypervariable region residue(s) are replaced by alanine or polyalanine residue(s). Those hypervariable region residue(s) demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other mutations at or for the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation per se need not be predetermined. Similar substitutions can be attempted with other amino acids, depending on the desired property of the scanned residues.

[0058] A more systematic method for identifying amino acid residues to modify comprises identifying hypervariable region residues involved in binding

CXCR5 and those hypervariable region residues with little or no involvement with CXCR5 binding. An alanine scan of the non-binding hypervariable region residues is performed, with each ala mutant tested for enhancing binding to CXCR5. In another embodiment, those residue(s) significantly involved in binding CXCR5 are selected to be modified. Modification can involve deletion of a residue or insertion of one or more residues adjacent to a residue of interest. However, normally the modification involves substitution of the residue by another amino acid. A conservative substitution can be a first substitution. If such a substitution results in a change in biological activity (e.g., binding affinity), then another conservative substitution can be made to determine if more substantial changes are obtained.

[0059] Even more substantial modification in an antibody range and presentation of biological properties can be accomplished by selecting an amino acid that differs more substantially in properties from that normally resident at a site. Thus, such a substitution can be made while maintaining: (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation; (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

[0060] For example, the naturally occurring amino acids can be divided into groups based on common side chain properties:

[0061] (1) hydrophobic: methionine (M or met), alanine (A or ala), valine (V or val), leucine (L or leu) and isoleucine (I or ile);

[0062] (2) neutral, hydrophilic: cysteine (C or cys), serine (S or ser), threonine (T or thr), asparagine (N or asn) and glutamine (Q or gln);

[0063] (3) acidic: aspartic acid (D or asp) and glutamic acid (E or glu);

[0064] (4) basic: histidine (H or his), lysine (K or lys) and arginine (R or arg);

[0065] (5) residues that influence chain orientation: glycine (G or gly) and proline (P or pro), and

[0066] (6) aromatic: tryptophan (W or trp), tyrosine (Y or tyr) and phenylalanine (F or phe).

[0067] Non-conservative substitutions can entail exchanging an amino acid with an amino acid from another group. Conservative substitutions can entail exchange of one amino acid for another within a group.

[0068] Preferred amino acid substitutions include those which: (1) reduce susceptibility to proteolysis, (2) reduce susceptibility to oxidation, (3) alter binding affinity and (4) confer or modify other physico-chemical or functional properties of such analogs. Analogs can include various muteins of a sequence other than the naturally occurring peptide sequence. For example, single or multiple amino acid substitutions (preferably conservative amino acid substitutions) may be made in the naturally-occurring sequence (preferably in the portion of the polypeptide outside the domain (s) forming intermolecular contacts. A conservative amino acid substitution should not substantially change the structural characteristics of the parent sequence (e. g., a replacement amino acid should not tend to break a helix that occurs in the parent sequence, or disrupt other types of secondary structure that characterizes the parent sequence) unless of a change in the bulk or conformation of the R group or side chain, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

[0069] Ordinarily, the antibody mutant with improved biological properties will have an amino acid sequence having at least 75% amino acid sequence identity or similarity with the amino acid sequence of either the heavy or light chain variable domain of the parent anti-human CXCR5 antibody, at least 80%, at least 85%, at least 90% and often at least 95% identity. Identity or similarity with respect to parent antibody sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical (i.e., same residue) or similar (i.e., amino acid residue from the same group based on common side-chain properties, *supra*) with the parent antibody residues, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity.

[0070] Alternatively, antibody mutants can be generated by systematic mutation of the FR and CDR regions of the heavy and light chains, or the F_c region of the anti-CXCR5 antibody. Another procedure for generating antibody mutants involves the use of affinity maturation using phage display (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) and Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Bacteriophage coat-protein fusions (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); and U.S. Pat. No. 5,223,409) are known to be useful for linking the phenotype of displayed proteins or peptides to the genotype of bacteriophage particles which encode them. The F_{ab} domains of antibodies have also been displayed on phage (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991); and Garrard et al. Biotechnol 9:1373 (1991)).

[0071] Monovalent phage display consists of displaying a set of protein variants as fusions of a bacteriophage coat protein on phage particles (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). Affinity maturation, or improvement of equilibrium binding affinities of various proteins, has previously been achieved through successive application of mutagenesis, monovalent phage display and functional analysis (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); and U.S. Pat. No. 5,534,617), for example, by focusing on the CDR regions of antibodies (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); and Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).

[0072] Libraries of many (for example, 10^6 or more) protein variants, differing at defined positions in the sequence, can be constructed on bacteriophage particles, each of which contains DNA encoding the particular protein variant. After cycles of affinity purification, using an immobilized antigen, individual bacteriophage clones are isolated, and the amino acid sequence of the displayed protein is deduced from the DNA.

[0073] Following production of the antibody mutant, the biological activity of that molecule relative to the parent antibody can be determined as taught herein. As noted above, that may involve determining the binding affinity and/or other biological

activities or physical properties of the antibody. In a preferred embodiment of the invention, a panel of antibody mutants are prepared and are screened for binding affinity for the antigen. One or more of the antibody mutants selected from the screen are optionally subjected to one or more further biological activity assays to confirm that the antibody mutant(s) have new or improved properties. In preferred embodiments, the antibody mutant retains the ability to bind CXCR5 with a binding affinity similar to or better/higher than that of the parent antibody.

[0074] The antibody mutant(s) so selected may be subjected to further modifications, often depending on the intended use of the antibody. Such modifications may involve further alteration of the amino acid sequence, fusion to heterologous polypeptide(s) and/or covalent modifications. For example, a cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody mutant may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and to prevent aberrant cross-linking. Conversely, a cysteine may be added to the antibody to improve stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an F_v fragment).

[0075] Another type of antibody mutant has an altered glycosylation pattern. That may be achieved by deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody and/or by adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody. Glycosylation of antibodies is typically either N-linked to Asn or O-linked to Ser or Thr. The tripeptide sequences, asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are common recognition sequences for enzymatic attachment of a carbohydrate moiety to the asparagine side chain. N-acetylgalactosamine, galactose, fucose or xylose, for example, are bonded to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine also may be used. Addition or substitution of one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody can enhance the likelihood of O-linked glycosylation.

[0076] It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody. For

[0077] Covalent modifications of the antibody are included within the scope of the invention. Such may be made by chemical synthesis or by enzymatic or chemical cleavage of the antibody, if applicable. Other types of covalent modifications of the antibody are introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the antibody with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or with the N-terminal or C-terminal residue.

[0078] Cysteinyl residues can be reacted with α-haloacetates (and corresponding amines), such as chloroacetic acid or chloroacetamide, to yield carboxylmethyl or carboxyamidomethyl derivatives. Cysteinyl residues also can be derivatized by reaction with bromotrifluoroacetone, α-bromo-β-(5-imidozoyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate, N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercura-4-nitrophenol or chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, for example.

[0079] Histidyl residues can be derivatized by reaction with diethylpyrocarbonate at pH 5.5-7.0. p-bromophenacyl bromide also can be used, the reaction is preferably performed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.0.

[0080] Lysinyl and α terminal residues can be reacted with succinic or other carboxylic acid anhydrides to reverse the charge of the residues. Other suitable reagents for derivatizing α-amino-containing residues include imidoesters, such as methyl picolinimidate, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride,

trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea and 2,4-pentanedione, and the amino acid can be transaminase-catalyzed with glyoxylate.

[0081] Arginyl residues can be modified by reaction with one or several conventional reagents, such as phenylglyoxal, 2,3-butanedione, 1,2-cyclohexanedione and ninhydrin. Derivatization of arginine residues often requires alkaline reaction conditions. Furthermore, the reagents may react with lysine as well as the arginine ε-amino group.

[0082] The specific modification of tyrosyl residues can be made with aromatic diazonium compounds or tetranitromethane. For example, N-acetylimidizole and tetranitromethane are used to form O-acetyl tyrosyl species and 3-nitro derivatives, respectively. Tyrosyl residues can be iodinated using ^{125}I or ^{131}I to prepare labeled proteins for use in a radioimmunoassay.

[0083] Carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl) can be modified by reaction with carbodiimides (R-N=C=C-R'), where R and R' can be different alkyl groups, such as 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide or 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Furthermore, aspartyl and glutamyl residues can be converted to asparaginyl and glutaminyl residues by reaction with ammonium ions.

[0084] Glutaminyl and asparaginyl residues are frequently deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, under neutral or basic conditions. The deamidated form of those residues falls within the scope of this invention.

[0085] Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of serinyl or threonyl residues, methylation of the α-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetylation of the N-terminal amine and amidation of any C-terminal carboxyl group.

[0086] Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to the antibody. Those procedures do not require

production of the antibody in a host cell that has glycosylation capabilities for N-linked or O-linked glycosylation. Depending on the coupling mode used, the sugar(s) may be attached to: (a) arginine and histidine; (b) free carboxyl groups; (c) free sulfhydryl groups, such as those of cysteine; (d) free hydroxyl groups, such as those of serine, threonine or hydroxyproline; (e) aromatic residues such as those of phenylalanine, tyrosine or tryptophan; or (f) the amide group of glutamine. Such methods are described in WO 87/05330 and in Aplin & Wriston, CRC Crit Rev Biochem, pp. 259-306 (1981).

[0087] Removal of any carbohydrate moieties present on the antibody may be accomplished chemically or enzymatically. Chemical deglycosylation, for example, can require exposure of the antibody to the compound, trifluoromethanesulfonic acid, or an equivalent compound, resulting in cleavage of most or all sugars except the linking sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine), while leaving the antibody intact. Chemical deglycosylation is described, for example, in Hakimuddin et al. Arch Biochem Biophys 259:52 (1987) and in Edge et al., Anal Biochem 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on antibodies can be achieved by any of a variety of endoglycosidases and exoglycosidases as described, for example, in Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350(1987).

[0088] Another type of covalent modification of the antibody comprises linking the antibody to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol or polyoxylalkylenes, in the manner set forth in U.S. Pat. Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

[0089] Another technique preferred for obtaining mutants or muteins is affinity maturation by phage display (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992); and Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838 (1991)). Briefly, several hypervariable region sites (e.g., 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibody mutants thus generated are displayed in monovalent fashion on phage particles as fusions to a protein found on the particles. The phage expressing the various mutants can be cycled through rounds of binding

[0090] The method of selecting novel binding polypeptides can utilize a library of structurally related polypeptides. The library of structurally related polypeptides, for example, fused to a phage coat protein, is produced by mutagenesis, and is displayed on the surface of the particle. The particles then are contacted with a target molecule and those particles having the highest affinity for the target are separated from those of lower affinity. The high affinity binders then are amplified by infection of a suitable bacterial host and the competitive binding step is repeated. The process is repeated until polypeptides of the desired affinity are obtained.

[0091] Alternatively, multivalent phage (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; and Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628) also can be used to express random point mutations (for example, generated by use of an error-prone DNA polymerase) to generate a library of phage antibody fragments which then could be screened for affinity to CXCR5, Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 254:889-896.

[0092] Preferably, during the affinity maturation process, the replicable expression vector is under tight control of a transcription regulatory element, and the culturing conditions are adjusted so the amount or number of particles displaying more than one copy of the fusion protein is less than about 1%. Also preferably, the amount of particles displaying more than one copy of the fusion protein is less than 10% of the amount of particles displaying a single copy of the fusion protein. Preferably the amount is less than 20%.

[0093] Functional equivalents may be produced by interchanging different CDRs of different antibody chains within a framework or a composite FR derived from plural antibodies. Thus, for example, different classes of antibody are possible for a given set of CDRs by substitution of different heavy chains, for example, IgG_{1-4}, IgM, IgA_{1-2} or IgD, to yield differing CXCR5 antibody types and isotypes. Similarly, artificial antibodies within the scope of the invention may be produced by embedding a given set of CDRs within an entirely synthetic framework.

[0094] For example, a suitable framework and F_c portion to carry the variable region or one or more CDR's of interest is obtained from an IgG4 molecule, which has reduced effector function.

[0095] In other embodiments, to enhance the properties of a CXCR5-binding molecule of interest, certain modifications can be made to the framework portion and/or F_c portion of the molecule carrying the antigen-binding portion of a molecule of interest. For example, amino acid substitutions can be made to enhance or to reduce properties of interest. Thus, in an IgG4 molecule, substitutions at sites known to impact function, for example, in the hinge region, in a region that impacts an effector function or that impacts F_c binding, for example, are suitable for modification. In an IgG4 molecule, substitutions, using Kabat numbering, at amino acid 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255 and so on, or combinations thereof, can be made to obtain desired properties. For example, substituting a proline for serine 241 can stabilize the tertiary and quaternary structures of the molecule (Mol Imm 30(1)105-108, 1993), and substituting glutamic acid for leucine 248 can dampen effector function(s) (J Imm 164(4)1925-1033, 2000; and Clin Imm 98(2)164-174, 2001).

[0096] Another beneficial property is obtaining an antibody derivative which binds CXCR5 but, for example, does not deplete B cells. That can be advantageous as antibody production in a patient is not compromised. Treatment with such a reagent also facilitates a combination regimen with a second drug for a particular indication that acts at a level other than at the B cell. That may be at the level of the T cell, for example.

[0097] Hence, for example, 16D7-HC1-LC3 was treated to contain two substitutions, S241P and L248E. The proline and glutamic acid residues confer desired properties on a CXCR5-binding molecule of interest carrying an IgG4 framework, such as, stability and reduced effector function.

[0098] The antibody fragments and functional equivalents of the present invention encompass those molecules with a detectable degree of specific binding to

CXCR5. A detectable degree of binding includes all values in the range of at least 10-100%, preferably at least 50%, 60% or 70%, more preferably at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% of the binding ability of an antibody of interest. Also included are equivalents with an affinity greater than 100% that of an antibody of interest.

[0099] The CDRs generally are of importance for epitope recognition and antibody binding. However, changes may be made to residues that comprise the CDRs without interfering with the ability of the antibody to recognize and to bind the cognate epitope. For example, changes that do not impact epitope recognition, yet increase the binding affinity of the antibody for the epitope, may be made. Several studies have surveyed the effects of introducing one or more amino acid changes at various positions in the sequence of an antibody, based on the knowledge of the primary antibody sequence, on the properties thereof, such as binding and level of expression (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; and Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

[00100] Thus, equivalents of an antibody of interest can be generated by changing the sequences of the heavy and light chain genes in the CDR1, CDR2 or CDR3, or framework regions, using methods such as oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis, cassette mutagenesis, error-prone PCR, DNA shuffling or mutator-strains of *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; and Adey et al., 1996, Chap. 16, pp. 277-291, in Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). The methods of changing the nucleic acid sequence of the primary antibody can result in antibodies with improved affinity (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; and Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

[00101] Repeated cycles of "polypeptide selection" can be used to select for higher and higher affinity binding by, for example, the selection of multiple

amino acid changes which are selected by multiple selection of cycles. Following a first round of selection, involving a first region of selection of amino acids in the ligand or antibody polypeptide, additional rounds of selection in other regions or amino acids of the ligand are conducted. The cycles of selection are repeated until the desired affinity properties are achieved.

[00102] Improved antibodies also include those antibodies having improved characteristics that are prepared by the standard techniques of animal immunization, hybridoma formation and selection for antibodies with specific characteristics.

[00103] "Antagonist" refers to a molecule capable of inhibiting one or more biological activities of a target molecule, such as signaling by CXCR5. Antagonists may interfere with the binding of a receptor to a ligand and vice versa, by incapacitating or killing cells activated by a ligand, and/or by interfering with receptor or ligand activation (e.g., tyrosine kinase activation) or signal transduction after ligand binding to a receptor. The antagonist may completely block receptor-ligand interactions or may substantially reduce such interactions. All such points of intervention by an antagonist shall be considered equivalent for purposes of the instant invention. Thus, included within the scope of the invention are antagonists (e.g., neutralizing antibodies) that bind to CXCR5, CXCL13 or other ligands of CXCR5, or a complex of CXCR5 and a ligand thereof, such as CXCL13; amino acid sequence variants or derivatives of CXCR5 or CXCL13 which antagonize the interaction between CXCR5 and a ligand, such as CXCL13; soluble CXCR5, optionally fused to a heterologous molecule such as an immunoglobulin region (e.g., an immunoadhesin); a complex comprising CXCR5 in association with another receptor or biological molecule; synthetic or native sequence peptides which bind to CXCR5; and so on.

[00104] "Agonist" refers to a compound, including a protein, a polypeptide, a peptide, an antibody, an antibody fragment, a conjugate, a large molecule, a small molecule, which activates one or more biological activities of CXCR5. Agonists may interact with the binding of a receptor to a ligand and vice

[00105] The terms "cell," "cell line," and "cell culture" include progeny thereof. It is also understood that all progeny may not be precisely identical, such as in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutation. Variant progeny that have the same function or biological property of interest, as screened for in the original cell, are included. The "host cells" used in the present invention generally are prokaryotic or eukaryotic hosts, selected as a design choice.

[00106] "Transformation" of a cellular organism, cell or cell line with a nucleic acid means introducing a nucleic acid into the target cell so that the nucleic acid is replicable, either as an extrachromosomal element or by chromosomal integration, and, optionally, expressed. "Transfection" of a cell or organism with a nucleic acid refers to the taking up of the nucleic acid, e.g., an expression vector, by the cell or organism whether or not any coding sequences are in fact expressed. The terms "transfected host cell" and "transformed" refer to a cell in which a nucleic acid was introduced. Typical prokaryotic host cells include various strains of *E. coli*. Typical eukaryotic host cells are mammal cells, such as Chinese hamster ovary, or cells of human origin. The introduced nucleic acid sequence may be from the same species as the host cell or of a different species from the host cell, or may be a hybrid nucleic acid sequence, containing some foreign and some homologous nucleic acids.

[00107] The term "vector" means a nucleic acid construct, a carrier, containing a nucleic acid, the transgene, the foreign gene or the gene of interest, which can be operably linked to suitable control sequences for expression of the transgene in a suitable host. Such control sequences include, for example, a promoter to effect transcription, an optional operator sequence to control such transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosome binding sites and sequences which control the termination of transcription and translation. The vector may be a plasmid, a phage particle or just a potential genomic insert. Once transformed into a suitable host, the vector may replicate and function independently of the host genome, or may in some instances, integrate into the host cell genome. In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably, as the plasmid is a commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of vectors which serve equivalent carrier function as and which are, or become, known in the art, such as viruses, synthetics molecules that carry nucleic acids, liposomes and the like.

[00108] "Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including human, domestic and farm animals, nonhuman primates, and zoo, sports or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows etc.

[00109] The antibodies of interest can be screened or can be used in an assay as described herein or as known in the art. Often, such assays require a reagent to be detectable, that is, for example, labeled. The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which can be conjugated directly or indirectly to a molecule or protein, e.g., an antibody. The label may itself be detectable (e.g., radioisotope labels, particles or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

[00110] As used herein, "solid phase" means a non-aqueous matrix to which an entity or molecule, such as the antibody of the instant invention, can adhere.

Example of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others can be used in a purification column (e.g., an affinity chromatography column). Thus, the solid phase can be a paper, a bead, a plastic, a chip and so on, can be made from a variety of materials, such as nitrocellulose, agarose, polystyrene, polypropylene, silicon and so on, and can be in a variety of configurations.

[00111] Soluble CXCR5 or fragments thereof, such as the extracellular domain (EC) domain, can be used as immunogens for generating antibodies of interest. The immunogen can be obtained or isolated from natural sources or can be made recombinantly. Whole cells, such as $CXCR5^{+}$ cells, cells derived from a natural source (e.g., B cell, B cell lines or cancer cell lines) or cells transformed (or transfected) by recombinant techniques to express, and perhaps to overexpress CXCR5, may be used as the immunogen for making the antibodies of interest. Also, membrane preparations carrying CXCR5 or synthetic peptides or truncated polypeptides corresponding to the EC regions of CXCR5 can be used, as known in the art.

[00112] The EC, which is about 60 amino acids in length, or portions thereof, of CXCR5 can be used as the immunogen. Other forms of the immunogen useful for preparing antibodies, such as a conjugate, will be apparent to those in the art. Thus, CXCR5, or portions thereof, can be attached to a carrier molecule, such as albumin or KLH, to be used as an immunogen. Of course, with cells expressing CXCR5, it is the EC domain which is the preferred immunogen or portion of the immunogen.

[00113] The gene or a cDNA encoding CXCR5, as known in the art, may be cloned in a plasmid or other expression vector and expressed in any of a number of expression systems according to methods well known to those of skill in the art,. and see below, for example. Because of the degeneracy of the genetic code, a

multitude of nucleotide sequences encoding CXCR5 protein or polypeptides may be used in the practice of expressing recombinant CXCR5 or functional products thereof. The nucleotide sequence may vary by selecting combinations based on possible codon choices, such as those preferred by the host cell. The combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the nucleotide sequence that codes for naturally occurring CXCR5 and all such variations may be considered. Thus, the CXCR5-encoding sequence can be recoded to contain codons expressing the amino acid of interest, however, the triplet codon is one favored by the gene expression machinery of the host cell, such as a human cell. Any one of those polypeptides may be used in the immunization of an animal, such as a camelid, or other system to generate antibodies that bind to CXCR5.

[00114] As mentioned above, the CXCR5 immunogen may, when beneficial, be expressed as a fusion protein that has CXCR5 attached to a fusion segment, which generally is a polypeptide with one or more beneficial functions. The fusion segment often aids in protein purification, e.g., by permitting the fusion protein to be isolated and purified by affinity chromatography, but can also be used to increase immunogenicity. Fusion proteins can be produced by culturing a recombinant cell transformed with a fusion nucleic acid sequence that encodes a protein attached to either the carboxyl and/or amino terminal end of the CXCR5 polypeptide. Fusion segments may include, but are not limited to, immunoglobulin F_c regions, glutathione-S-transferase, β-galactosidase, a poly-histidine segment capable of binding to a divalent metal ion and maltose binding protein.

[00115] Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence mutants can be prepared by a variety of methods known in the art. The methods include, but are not limited to, oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis and cassette mutagenesis of an earlier prepared mutant or a non-mutant version of the molecule of interest, (see, for example, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985)).

[00116] Recombinant expression of an antibody of the invention, or fragment, derivative or analog thereof, (e.g., a heavy or light chain of an antibody of

the invention, a single chain antibody of the invention or an antibody mutein of the invention) includes construction of an expression vector containing a polynucleotide that encodes the antibody or a fragment of the antibody as described herein. Once a polynucleotide encoding an antibody molecule has been obtained, the vector for the production of the antibody may be produced by recombinant DNA technology as known in the art. An expression vector is constructed containing antibody coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. The methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques and *in vivo* genetic recombination.

[00117] The expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques and the transfected cells then are cultured by conventional techniques to produce an antibody or fragment of the invention. In one aspect of the invention, vectors encoding both the heavy and light chains may be co-expressed in the host cell for expression of the entire immunoglobulin molecule, as detailed herein.

[00118] A variety of host/expression vector systems may be utilized to express the antibody molecules of the invention. Such expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express an antibody molecule of the invention *in situ*. Bacterial cells, such as *E. coli*, and eukaryotic cells are commonly used for the expression of a recombinant antibody molecule, especially for the expression of whole recombinant antibody molecule. For example, mammal cells such as CHO cells, in conjunction with a vector, such as one carrying the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus, are an effective expression system for antibodies (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); and Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)). Plants and plant cell culture, insect cells and so on also can be used to make the proteins of interest, as known in the art.

[00119] In addition, a host cell is chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing

(e.g., cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the expressed antibody of interest. Hence, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include, but are not limited to, CHO, COS, 293, 3T3 or myeloma cells.

[00120] For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the antibody molecule may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites etc.) and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for one to two days in an enriched media, and then are moved to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into a chromosome and be expanded into a cell line. Such engineered cell lines not only are useful for antibody production but are useful in screening and evaluation of compounds that interact directly or indirectly with the antibody molecule.

[00121] A number of selection systems may be used, including but not limited to the *Herpes simplex* virus thymidine kinase (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), glutamate synthase selection in the presence of methionine sulfoximide (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 and see the website or literature of Lonza Group Ltd.) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) genes in tk, hgprt or aprt cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which

[00122] The expression levels of an antibody molecule can be increased by vector amplification (for example, see Bebbington et al., in DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press (1987)). When a marker in the vector system expressing antibody is amplifiable, an increase in the level of inhibitor present in the culture will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the antibody gene, production of the antibody will also increase (Crouse et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

[00123] The host cell may be co-transfected with two or more expression vectors of the invention, for example, the first vector encoding a heavy chain-derived polypeptide and the second vector encoding a light chain-derived polypeptide. The two vectors may contain identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes, and is capable of expressing, both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain should be placed before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy chain (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); and Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). The coding sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

[00124] Once an antibody molecule of the invention has been produced by an animal, chemically synthesized or recombinantly expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an immunoglobulin molecule, for example, by chromatography (e.g., ion exchange, affinity, particularly by affinity for CXCR5 after Protein A and size-exclusion chromatography and so on), centrifugation, differential solubility or by any other standard technique for the purification of proteins. In addition, the antibodies of the instant invention or fragments thereof can be fused to heterologous polypeptide sequences described herein or otherwise known in the art, to facilitate purification.

[00125] Recombinant CXCR5 protein, as exemplified in the examples below, was used to immunize mice to generate the hybridomas that produce monoclonal antibodies of the present invention. The monoclonals obtained were selected for those with beneficial therapeutic potential, for example, preventing binding of CXCR5 ligand thereto. The selected antibodies then were modified to obtain beneficial properties, such as having enhanced stability *in vivo*.

[00126] The antibodies of the present invention may be generated by any suitable method known in the art. The antibodies of the present invention may comprise polyclonal antibodies, although because of the modification of antibodies to optimize use in human, as well as to optimize the use of the antibody per se, monoclonal antibodies are preferred because of ease of production and manipulation of particular proteins. Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan (Harlow et al., Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

[00127] For example, an immunogen, as exemplified herein, may be administered to various host animals including, but not limited to, rabbits, mice, camelids, rats etc., to induce the production of serum containing polyclonal antibodies specific for CXCR5. The administration of the immunogen may entail one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, and include but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral oil,

gels, alum (aluminum hydroxide), surface active substances, such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins (KLH), dinitrophenol and potentially useful human adjuvants, such as BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*. Additional examples of adjuvants which may be employed include the MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). Immunization protocols are well known in the art and may be performed by any method that elicit an immune response in the animal host chosen. Thus, various administration routes can be used over various time periods as a design choice.

[00128] Typically, the immunogen (with or without adjuvant) is injected into the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections, or intramuscularly or intravenously. The immunogen may include a CXCR5 polypeptide, a fusion protein, or variants thereof, which may be produced by a cell that produces or overproduces CXCR5, which may be a naturally occurring cell, a naturally occurring mutant cell or a genetically engineered cell. In certain circumstances, whole cells expressing CXCR5 can be used. Depending on the nature of the polypeptides (i.e., percent hydrophobicity, percent hydrophilicity, stability, net charge, isoelectric point etc.), the CXCR5 or portion thereof may be modified or conjugated to be immunogenic or more immunogenic in the animal, such as a mammal, being immunized. For example, CXCR5 or a portion thereof can be conjugated to a carrier. The conjugation includes either chemical conjugation by derivatizing active chemical functional groups to both the immunogen and the immunogenic protein to be conjugated such that a covalent bond is formed, or through fusion-protein based methodology, or other methods known to the skilled artisan. Examples of such carriers or immunogenic proteins include, but are not limited to, KLH, ovalbumin, serum albumin, bovine thyroglobulin, soybean trypsin inhibitor, and promiscuous T helper peptides. Various adjuvants may be used to increase the immunological response as described above.

[00129] Once a suitable preparation is obtained, it is possible to isolate particular antibodies from the plural antibodies by known separation techniques, such

as affinity chromatography, panning, absorption and so on. In that way, an individual antibody species can be obtained for further study, for example, sequencing to obtain the amino acid sequences of one or more CDRs.

[00130] The antibodies of the present invention preferably comprise monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma technology, such as described by Kohler et al., Nature 256:495 (1975); U.S. Pat. No. 4,376,110; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) and Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981), recombinant DNA methods, for example, making and using transfectomas, or other methods known to the artisan. Other examples of methods which may be employed for producing monoclonal antibodies include, but are not limited to, the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); and Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA and IgD, and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAb of the invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*.

[00131] In the hybridoma model, a host such as a mouse, a humanized mouse, a transgenic mouse with human immune system genes, hamster, rabbit, rat, camel or any other appropriate host animal, is immunized to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that specifically bind to CXCR5. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)).

[00132] Generally, in making antibody-producing hybridomas, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells,

particularly myeloma cells of rodent, bovine or human origin. Typically, a rat or mouse myeloma cell line is employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"), substances that prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

[00133] Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from the MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. and SP2/0, FO or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

[00134] Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); and Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pp. 51-63 (1987)). The mouse myeloma cell line NSO may also be used (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

[00135] Another alternative is to use electrical fusion rather than chemical fusion to form hybridomas. Instead of fusion, a B cell can be immortalized using, for example, Epstein Barr Virus or another transforming gene, see, e.g., Zurawaki et al., in Monoclonal Antibodies, ed., Kennett et al., Plenum Press, pp. 19-33. (1980). Transgenic mice expressing immunoglobulins and severe combined immunodeficient (SCID) mice transplanted with human B lymphocytes also can be used.

[00136] The culture medium in which hybridoma cells are grown is assayed for production of monoclonal antibodies directed against CXCR5. The

binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells may be determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA), fluorocytometric analysis (FACS) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques are known in the art and are within the skill of the artisan. The binding affinity of the monoclonal antibody to CXCR5 can, for example, be determined by a Scatchard analysis (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

[00137] After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Suitable culture media include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

[00138] The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated or isolated from the culture medium, ascites fluid or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, protein G-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel exclusion chromatography, gel electrophoresis, dialysis or affinity chromatography.

[00139] A variety of methods exist in the art for the production of monoclonal antibodies and thus, the invention is not limited to their sole production in hybridomas. For example, the monoclonal antibodies may be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Pat. No. 4,816,567. In this context, the term "monoclonal antibody" refers to an antibody derived from a single eukaryotic, phage or prokaryotic clone.

[00140] DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies, or such chains from human, humanized or other sources) (Innis et al. in PCR Protocols. A Guide to Methods and

Applications, Academic (1990), and Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). The hybridoma cells serve as a source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, NS0 cells, COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one CXCR5-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

[00141] The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the F_c region so as to prevent heavy chain cross-linking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent cross-linking.

[00142] Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); and Brennan et al., Science 229:81 (1985)). For example, F_{ab} and $F_{(ab')2}$ fragments of the invention may be produced by proteolytic cleavage of immunoglobulin molecules, using enzymes such as papain (to produce F_{ab} fragments) or pepsin (to produce $F_{(ab')2}$ fragments). $F_{(ab')2}$ fragments contain the variable region, the light chain constant region and the constant region C_{H1} domain of the heavy chain. However, those fragments can be produced directly by recombinant

host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from an antibody phage library. Alternatively, $F_{(ab')2}$-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992). According to another approach, $F_{(ab')2}$ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain F_v fragment (F_v) (WO 93/16185).

[00143] For some uses, including *in vivo* use of antibodies in humans and *in vitro* detection assays, it may be preferable to use chimeric, humanized or human antibodies. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art, see e.g., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); and U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816397.

[00144] Humanized antibodies are derived from antibody molecules generated in a non-human species that bind CXCR5 wherein one or more CDRs therefrom are inserted into the FR regions from a human immunoglobulin molecule. Antibodies can be humanized using a variety of techniques known in the art including, for example, CDR grafting (EPO 239,400; WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,530,101; and 5,585,089), veneering or resurfacing (EPO 592,106; EPO 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); and Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), and chain shuffling (U.S. Pat. No. 5,565,332).

[00145] A humanized antibody has one or more amino acid residues from a source that is non-human. The non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the methods of Winter and co-workers (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); and Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), by substituting non-human CDRs or portions of CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies

(U.S. Pat. No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possible some FR residues are substituted from analogous sites in rodent antibodies. The heavy chain constant region, which can include one or more heaevy chain domains, and hinge region can be from any class or subclass to obtain a desired effect, such as a particular effector function.

[00146] Often, framework residues in the human framework regions can be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, and possibly improve, antigen binding. The framework substitutions are identified by methods known in the art, e.g., by modeling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions, see, e.g., U.S. Pat. No. 5,585,089; and Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

[00147] It is further preferable that humanized antibodies retain high affinity for CXCR5, and retain or acquire other favorable biological properties. Thus, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of the displays permits analysis of the likely role of certain residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind CXCR5. In that way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen, is maximized, although it is the CDR residues that directly and most substantially influence CXCR5 binding. The CDR regions also can be modified to contain one or

more amino acids that vary from that obtained from the parent antibody from which the CDR was obtained, to provide enhanced or different properties of interest, such as binding of greater affinity or greater avidity, for example.

[00148] Certain portions of the constant regions of antibody can be manipulated and changed to provide antibody homologs, derivatives, fragments and the like with properties different from or better than that observed in the parent antibody. Thus, for example, many IgG4 antibodies form intrachain disulfide bonds near the hinge region. The intrachain bond can destabilize the parent bivalent molecule forming monovalent molecules comprising a heavy chain with the associated light chain. Such molecules can reassociate, but on a random basis.

[00149] It was observed that modifying amino acids in the hinge region of IgG4 molecules can reduce the likelihood of intrachain bond formation, thereby stabilizing the IgG4 molecule, which will minimize the likelihood of forming bispecific molecules. That modification can be beneficial if a therapeutic antibody is an IgG4 molecule as the enhanced stability will minimize the likelihood of having the molecule dissociate during production and manufacture, as well as *in vivo*. A monovalent antibody may not have the same effectiveness as the bivalent parent molecule. For example, when bivalent IgG4 is administered to a patient, the percentage of bivalent IgG4 decays to about 30% over a two-week period. An amino acid substitution at position 228 enhances IgG4 stability. The serine that resides at 228 can be replaced with another amino acid, such as one of the remaining 19 amino acids. Such a change can be made particularly with recombinant antibodies wherein the nucleic acid coding sequence can be mutated to yield a replacement amino acid at position 228. For example, the S can be replaced with a proline.

[00150] Another set of amino acids suitable for modification include amino acids in the area of the hinge which impact binding of a molecule containing a heavy chain with binding to the F_c receptor and internalization of bound antibody. Such amino acids include, in IgG1 molecules, residues from about 233 to about 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEQ ID NO:49) from about 252 to about 256 (Met-Ile-Ser-

Arg-Thr) (SEQ ID NO:50) and from about 318 (Glu) to about 331 (Pro), including, for example, Lys_{320}, Lys_{322} and Pro_{329}.

[00151] Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including phage display methods described above using antibody libraries derived from human immunoglobulin sequences, see, U.S. Pat. Nos. 4,444,887 and 4,716,111; and WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 and WO 91/10741. The techniques of Cole et al. and Boerder et al. are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); and Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

[00152] Human antibodies can also be produced using transgenic mice which are incapable of expressing functional endogenous immunoglobulins, but which also express certain human immunoglobulin genes. For example, the human heavy and light chain immunoglobulin gene complexes may be introduced randomly or by homologous recombination into mouse embryonic stem cells. Alternatively, the human variable region, constant region and diversity region may be introduced into mouse embryonic stem cells, in addition to the human heavy and light chain genes. The mouse heavy and light chain immunoglobulin genes may be rendered non-functional separately or simultaneously with the introduction of the human immunoglobulin loci by homologous recombination. In particular, homozygous deletion of the JH region prevents endogenous antibody production. The modified embryonic stem cells are expanded and microinjected into blastocysts to produce chimeric mice. The chimeric mice are then bred to produce homozygous offspring which express human antibodies, see, e.g., Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); and Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)).

[00153] The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a CXCR5, e.g., all or a portion of CXCR5, such as the EC domain thereof. Monoclonal antibodies directed against CXCR5 can be obtained from the immunized,

transgenic mice using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA, IgM and IgE antibodies. For an overview, see Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). For a discussion of producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, e.g., WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; and WO 96/33735; EPO No. 0 598 877; and U.S. Pat. Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; and 5,939,598. In addition, companies such as Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) and Medarex, Inc. (Princeton, NJ) can be engaged to provide human antibodies directed against CXCR5 using technology similar to that described above.

[00154] Also, human mAbs could be made by immunizing mice transplanted with human peripheral blood leukocytes, splenocytes or bone marrow (e.g., trioma technique of XTL Biopharmaceuticals, Israel). Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In that approach, a selected non-human monoclonal antibody, e.g., a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

[00155] When using recombinant techniques, the antibody variant can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium. If the antibody variant is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, may be removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) describe a procedure for isolating antibodies which are secreted to the periplasmic space of *E. coli*. Briefly, cell paste is exposed to sodium acetate (pH 3.5) and EDTA. Cell debris can be removed by centrifugation. Where the antibody variant is secreted into the medium, supernatant from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example,

an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included to inhibit proteolysis, and antibiotics may be included to prevent growth of adventitious contaminants.

[00156] The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis and affinity chromatography. The suitability of protein A or protein G as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin F_c domain that is present in the antibody variant. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human IgG1, IgG2 or IgG4 heavy chains (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Protein G can be used for mouse isotypes and for human IgG3 (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices, such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene, allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody variant comprises a C_{H3} domain, the Bakerbond ABXTM resin (JT Baker; Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification, such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin agarose chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE and ammonium sulfate precipitation are also available, depending on the antibody or variant to be recovered.

[00157] Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody or variant of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH of between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25 M salt).

[00158] Further, antibodies of the invention can, in turn, be utilized to generate anti-idiotype antibodies that "mimic" CXCR5 using techniques well known to those skilled in the art (see, e.g., Greenspan et al., FASEB J 7:437 (1989); and Nissinoff, J Immunol 147:2429 (1991)). For example, antibodies which bind to and

[00159] The antibodies of the present invention may be bispecific antibodies. Bispecific antibodies can be monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present invention, one of the binding specificities is directed towards CXCR5, the other may be for any other antigen, such as a cell-surface protein, receptor, receptor subunit, ligand, tissue-specific antigen, virally-derived protein, virally-encoded envelope protein, bacterially-derived protein, bacterial surface protein etc. Thus, the other specificity could be to CXCL13.

[00160] Methods for making bispecific antibodies are well known. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain/light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein et al., Nature 305:537 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, the hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 and in Traunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991). Other methods for making bispecific antibodies are provided in, for example, Kufer et al., Trends Biotech 22:238-244, 2004.

[00161] Antibody variable domains with the desired binding specificities can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, C_{H2}, and C_{H3} regions. It may have the first heavy chain constant region (C_{H1}) containing the site necessary for light chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions

and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transformed into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example Suresh et al., Meth Enzym 121:210 (1986).

[00162] Heteroconjugate antibodies are also contemplated by the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Pat. No. 4,676,980). It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioester bond. Examples of suitable reagents for that purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate, and those disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,676,980.

[00163] In addition, one can generate single-domain antibodies to CXCR5. Examples of that technology have been described in WO9425591 for antibodies derived from Camelidae heavy chain Ig, as well as in US20030130496 describing the isolation of single domain fully human antibodies from phage libraries.

[00164] Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, Science 242:423 (1988); Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988); and Ward, et al., Nature 334:544 (1989)) can be adapted to produce single chain antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the F_v region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Techniques for the assembly of functional F_v fragments in *E. coli* may also be used (Skerra et al., Science 242:1038 (1988)).

[00165] The instant invention encompasses antibodies recombinantly fused or chemically conjugated (including both covalently and non-covalently conjugations) to a polypeptide. Fused or conjugated antibodies of the present invention may be used for ease in purification, see e.g., WO 93/21232; EP 439,095;

Naramura et al., Immunol Lett 39:91 (1994); U.S. Pat. No. 5,474,981; Gillies et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); and Fell et al., J Immunol 146:2446 (1991). The marker amino acid sequence can be a hexa-histidine peptide (SEQ ID NO:51), such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), among others, many of which are commercially available, Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989). Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the "HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) and the "flag" tag.

[00166] One can also create a single peptide chain binding molecules in which the heavy and light chain F_v regions are connected. Single chain antibodies ("scF_v") and the method of their construction are described in, for example, U.S. Pat. No. 4,946,778. Alternatively, F_{ab} can be constructed and expressed by similar means. All of the wholly and partially human antibodies can be less immunogenic than wholly murine mAbs, and the fragments and single chain antibodies also can be less immunogenic.

[00167] Antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) and Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). Thus, the techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

[00168] Anti-CXCR5 antibodies are tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), FACS, Western immunoblotting or other immunochemical techniques as known in the art. Thus, B cells or cells expressing CXCR5 can be used to detect antibody binding thereto using a known technique, or

recombinantly expressed CXCR5 or portion thereof, such as the EC domain, can be adhered to a solid phase and used as a capture element in an assay, configured as a design choice.

[00169] To determine whether a particular antibody homolog binds to human CXCR5, any conventional binding assay may be used. Useful CXCR5 binding assays include FACS analysis, ELISA assays, radioimmunoassays and the like, which detect binding of antibody, and functions resulting therefrom, to human CXCR5. Full-length and soluble forms of human CXCR5 taught herein are useful in such assays. The binding of an antibody or homolog to CXCR5, or to soluble fragments thereof, may conveniently be detected through the use of a second antibody specific for immunoglobulins of the species from which the antibody or homolog is derived.

[00170] To determine whether a particular antibody or homolog does or does not significantly block binding of CXCL13 or other ligand to human CXCR5, any suitable competition assay may be used. Useful assays include, for example, ELISA assays, FACS assays, radioimmunoassays and the like that quantify the ability of the antibody or homolog to compete with CXCL13 or other ligand for binding to human CXCR5. Preferably, the ability of ligand to block binding of labeled human CXCR5 to immobilized antibody or homolog is measured.

[00171] The ability of an antibody or homolog to bind to human CXCR5 can be evaluated by testing the ability thereof to bind to human $CXCR5^+$ cells. Suitable $CXCR5^+$ cells for use in determining whether a particular antibody or homolog binds to human CXCR5 are mammal tissue culture cells transformed with DNA encoding full-length human CXCR5 and expressing the CXCR5 on the cell surface or B cell lines.

[00172] Binding of the antibody or homolog to the $CXCR5^+$ cell can be detected by staining the cells with a fluorescently-labeled second antibody specific for immunoglobulins of the same species from which the antibody homolog being tested is derived. A fluorescence activated cell sorter ("FACS") can be used to detect and to

quantify any binding, see generally, Shapiro, Practical Flow Cytometry, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. (1985).

[00173] Also, the ability of an antibody homolog to block binding of a ligand, such as CXCL13, to human CXCR5 can be determined by preincubating excess ligand with $CXCR5^+$ cells and quantifying the degree to which the bound ligand blocks binding of the antibody or homolog to the cells. Binding of the antibody homolog to the $CXCR5^+$ cells can be quantified by FACS analysis, using a fluorescently labeled second antibody specific for immunoglobulins of the same species from which the antibody homolog being tested is derived. Alternatively, a competition assay can be configured using labeled ligand or antibody as known in the art.

[00174] Ligand, such as CXCL13, used in the above assays may be provided by cells transformed with the gene for the ligand, or by isolated CXCL13, obtained practicing methods taught herein, or purchased commercially.

[00175] To determine whether a particular antibody or homolog causes no significant decrease in the number of circulating $CXCR5^+$ cells *in vivo*, the number of circulating $CXCR5^+$ cells isolated from a mammal within 24 hours after administration of the antibody or homolog to a mammal having normal immune function is quantified, and compared to the pre-administration number or the number in a control mammal to whom an isotype-matched antibody or homolog of irrelevant specificity has been administered instead of an antibody or homolog of the instant invention. Quantification of $CXCR5^+$ cells in animals dosed with a CXCR5 antibody or functional portion or derivative thereof may be accomplished, for example, by staining obtained cells with fluorescently-labeled antibodies that bind the anti-CXCR5 antibodies, as well as labeled antibodies specific for T cells and B cells, followed by FACS analysis.

[00176] Antibodies of the instant invention may be described or specified in terms of the epitope(s) or portion(s) of CXCR5 to which the antibody recognizes or specifically binds. The epitope(s) or polypeptide portion(s) may be

specified as described herein, e.g., by N-terminal and C-terminal positions, by size in contiguous amino acid residues, conformational epitopes and so on.

[00177] Antibodies of the instant invention may also be described or specified in terms of cross-reactivity. Antibodies that bind CXCR5 polypeptides, which have at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 65%, at least 60%, at least 55%, and at least 50% identity (as calculated using methods known in the art and described herein) to CXCR5 are also included in the instant invention.

[00178] Antibodies of the instant invention also may be described or specified in terms of binding affinity to a CXCR5 of interest. Anti-CXCR5 antibodies may bind with a K_D of less than about 10^{-7} M, less than about 10^{-6} M, or less than about 10^{-5} M. Higher binding affinities in an antibody of interest can be beneficial, such as those with an equilibrium dissociation constant or K_D of from about 10^{-8} to about 10^{-15} M, from about 10^{-8} to about 10^{-12} M, from about 10^{-9} to about 10^{-11} M, or from about 10^{-8} to about 10^{-10} M. The invention also provides antibodies that competitively inhibit binding of an antibody to an epitope of the invention as determined by any method known in the art for determining competitive binding, for example, the immunoassays described herein. In preferred embodiments, the antibody competitively inhibits binding to the epitope by at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%.

[00179] The instant invention also includes conjugates comprising an antibody of interest. The conjugates comprise two primary components, an antibody of interest and a second component, which may be a cell-binding agent, a cytotoxic agent and so on.

[00180] As used herein, the term "cell-binding agent" refers to an agent that specifically recognizes and binds to a molecule on the cell surface. Thus, the cell-binding agent can be a CD antigen, a pathogen antigen, such as a virus antigen, a differentiation antigen, a cancer antigen, a cell-specific antigen, a tissue-specific antigen, an Ig or Ig-like molecule and so on.

[00181] In one embodiment, the cell-binding agent specifically recognizes CXCL13 or the complex of CXCR5 and a ligand thereof, such as CXCL13. The conjugate may be in contact with the target cell for a sufficient period of time to allow an effector function of the conjugate to act on the cell, and/or to allow the conjugate sufficient time in which to be internalized by the cell.

[00182] Cell-binding agents may be of any type as presently known, or that become known, and includes peptides, non-peptides, saccharides, nucleic acids, ligands, receptors and so on, or combinations thereof. The cell-binding agent may be any compound that can bind a cell, either in a specific or non-specific manner. Generally, the agent can be an antibody (especially monoclonal antibodies), lymphokines, hormones, growth factors, vitamins, nutrient-transport molecules (such as transferrin), or any other cell-binding molecule or substance.

[00183] Other examples of cell-binding agents that can be used include: polyclonal antibodies; monoclonal antibodies; and fragments of antibodies such as F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ and F_v (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); and Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1960)).

[00184] The second component also can be a cytotoxic agent. The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that reduces or blocks the function, or growth, of cells and/or causes destruction of cells. Thus, the cytotoxic agent can be a taxol, a maytansinoid, such as DM1 or DM4, CC-1065 or a CC-1065 analog, a ricin, mitomycin C and so on. In some embodiments, the cytotoxic agent, as with any binding agent of a conjugate of the instant invention is covalently attached, directly or via a cleavable or non-cleavable linker, to an antibody of interest.

[00185] Examples of suitable maytansinoids include maytansinol and maytansinol analogs. Maytansinoids inhibit microtubule formation and are highly toxic to mammalian cells.

[00186] Examples of suitable maytansinol analogues include those having a modified aromatic ring and those having modifications at other positions. Such suitable maytansinoids are disclosed in U.S. Patent Nos. 4,424,219; 4,256,746;

4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; and 5,846,545.

[00187] Examples of suitable analogues of maytansinol having a modified aromatic ring include: (1) C-19-dechloro (U.S. Pat. No. 4,256,746) (prepared, for example, by LAH reduction of ansamytocin P2); (2) C-20-hydroxy (or C-20-demethyl) +/- C-19-dechloro (U.S. Pat. Nos. 4,361,650 and 4,307,016) (prepared, for example, by demethylation using Streptomyces or Actinomyces or dechlorination using lithium aluminum hydride (LAH)); and (3) C-20-demethoxy, C-20-acyloxy (-OCOR), +/-dechloro (U.S. Pat. No 4,294,757) (prepared by acylation using acyl chlorides).

[00188] Examples of suitable analogues of maytansinol having modifications of other positions include: (1) C-9-SH (U.S. Pat. No. 4,424,219) (prepared by the reaction of maytansinol with H_2S or P_2S_5); (2) C-14-alkoxymethyl (demethoxy/CH_2OR) (U.S. Pat. No. 4,331,598); (3) C-14-hydroxymethyl or acyloxymethyl (CH_2OH or CH_2OAc) (U.S. Pat. No. 4,450,254) (prepared from Nocardia); (4) C-15-hydroxy/acyloxy (U.S. Pat. No. 4,364,866) (prepared by the conversion of maytansinol by Streptomyces); (5) C-15-methoxy (U.S. Pat. Nos. 4,313,946 and 4,315,929) (isolated from Trewia nudiflora); (6) C-18-N-demethyl (U.S. Pat. Nos. 4,362,663 and 4,322,348) (prepared by the demethylation of maytansinol by Streptomyces); and (7) 4,5-deoxy (U.S. Pat. No 4,371,533) (prepared by the titanium trichloride/LAH reduction of maytansinol).

[00189] The cytotoxic conjugates may be prepared by *in vitro* methods. To link a cytotoxic agent, drug or prodrug to the antibody, commonly, a linking group is used. Suitable linking groups are known in the art and include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups and esterase labile groups. For example, conjugates can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond between an antibody of interest and the drug or prodrug.

[00190] As discussed above, the instant invention provides isolated nucleic acid sequences encoding an antibody or functional variant thereof as disclosed herein, vector constructs comprising a nucleotide sequence encoding the CXCR5-binding polypeptides of the present invention, host cells comprising such a vector, and recombinant techniques for the production of the polypeptide.

[00191] The vector normally contains components known in the art and generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker or selection genes, sequences facilitating and/or enhancing translation, an enhancer element and so on. Thus, the expression vectors include a nucleotide sequence operably linked to such suitable transcriptional or translational regulatory nucleotide sequences such as those derived from mammalian, microbial, viral or insect genes. Examples of additional regulatory sequences include operators, mRNA ribosomal binding sites, and/or other appropriate sequences which control transcription and translation, such as initiation and termination thereof. Nucleotide sequences are "operably linked" when the regulatory sequence functionally relates to the nucleotide sequence for the appropriate polypeptide. Thus, a promoter nucleotide sequence is operably linked to, e.g., the antibody heavy chain sequence if the promoter nucleotide sequence controls the transcription of that nucleotide sequence.

[00192] In addition, sequences encoding appropriate signal peptides that are not naturally associated with antibody heavy and/or light chain sequences can be incorporated into expression vectors. For example, a nucleotide sequence for a signal peptide (secretory leader) may be fused in-frame to the polypeptide sequence so that the antibody is secreted to the periplasmic space or into the medium. A signal peptide that is functional in the intended host cells enhances extracellular secretion of the appropriate antibody or portion thereof. The signal peptide may be cleaved from the polypeptide on secretion of antibody from the cell. Examples of such secretory signals are well known and include, e.g., those described in U.S. Pat. Nos. 5,698,435; 5,698,417; and 6,204,023.

[00193] The vector may be a plasmid, a single-stranded or double-stranded viral vector, a single-stranded or double-stranded RNA or DNA phage vector, a phagemid, a cosmid or any other carrier of a transgene of interest. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors also may be introduced into cells as packaged or encapsulated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells and using plural vectors carrying the various virus components necessary to produce a particle. Cell-free translation systems may also be employed to produce the protein using RNAs derived from the present DNA constructs (see, e.g., WO 86/05807 and WO 89/01036; and U.S. Pat. No. 5,122,464).

[00194] The antibodies of the present invention can be expressed from any suitable host cell. Examples of host cells useful in the instant invention include prokaryotic, yeast or higher eukaryotic cells and include but are not limited to microorganisms such as bacteria (e.g., *E. coli, B. subtilis,* Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Serratia, and Shigella, as well as Bacilli, Pseudomonas and Streptomyces) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing the antibody coding sequences of interest; yeast (e.g., Saccharomyces, Pichia, Actinomycetes, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida, Trichoderma, Neurospora, and filamentous fungi, such as Neurospora, Penicillium, Tolypocladium and Aspergillus) transformed with recombinant yeast expression vectors containing antibody coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., Baculovirus) containing antibody coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; or tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing antibody coding sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, 293 or 3T3 cells) harboring recombinant expression

constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter; or the vaccinia virus 7.5K promoter).

[00195] Expression vectors for use in prokaryotic host cells generally comprise one or more phenotypic selectable marker genes. A phenotypic selectable marker gene is, for example, a gene encoding a protein that confers antibiotic resistance or that supplies an autotrophic requirement. Examples of useful expression vectors for prokaryotic host cells include those derived from commercially available plasmids, such as pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) and the pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) series of vectors (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); and Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Promoter sequences commonly used for recombinant prokaryotic host cell expression vectors include T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)), β-lactamase (penicillinase), lactose promoter system (Chang et al., Nature 275:615 (1978); and Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), tryptophan (trp) promoter system (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), and tac promoter (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

[00196] Yeast vectors will often contain an origin of replication sequence, such as from a 2μ yeast plasmid, an autonomously replicating sequence (ARS), a promoter region, sequences for polyadenylation, sequences for transcription termination and a selectable marker gene. Suitable promoter sequences for yeast vectors include, among others, promoters for metallothionein, 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) or other glycolytic enzymes (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)) such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase and glucokinase. Other suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Other suitable promoters and vectors for yeast and

yeast transformation protocols are well known in the art. Yeast transformation protocols are well known. One such protocol is described by Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), which selects for Trp^+ transformants in a selective medium.

[00197] Any eukaryotic cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. Examples of invertebrate cells include plant and insect cells (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); and Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). For example, Baculovirus systems may be used for production of heterologous proteins. In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) may be used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). Other hosts that have been identified include Aedes, *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. A variety of viral strains for transfection are publicly available, e.g., the L-1 variant of AcNPV and the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV. Moreover, plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco and also be utilized as hosts as known in the art.

[00198] Vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells, in culture (tissue culture) can be a routine procedure, although fastidious cell lines do exist which require, for example, a specialized medium with unique factors, feeder cells and so on, see Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Examples of useful mammal host cell lines are monkey kidney; human embryonic kidney line; baby hamster kidney cells; Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells; human cervical carcinoma cells (for example, HeLa); canine kidney cells; human lung cells; human liver cells; mouse mammary tumor; and NS0 cells.

[00199] Host cells are transformed with vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient medium containing growth factors, vitamins, minerals and so on, as well as inducers appropriate for the cells and vectors used. Commonly used promoter sequences and enhancer sequences are derived from

polyoma virus, Adenovirus 2, Simian virus 40 (SV40) and human cytomegalovirus (CMV). DNA sequences derived from the SV40 viral genome may be used to provide other genetic elements for expression of a structural gene sequence in a mammalian host cell, e.g., SV40 origin, early and late promoter, enhancer, splice and polyadenylation sites. Viral early and late promoters are particularly useful because both are easily obtained from a viral genome as a fragment which may also contain a viral origin of replication. Exemplary expression vectors for use in mammalian host cells are commercially available.

[00200] Commercially available medium such as Ham's F10, Minimal Essential Medium (MEM), RPMI-1640 and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) are suitable for culturing host cells. In addition, any of the media described in Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979) and Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), and in U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; or 6,048,728 may be used as a culture medium for the host cells. Any of those media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin or epidermal growth factor), salts (such as chlorides, such as sodium, calcium or magnesium chloride; and phosphates), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics, trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range) and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may be included at appropriate concentrations, as a design choice. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, are as known in the art appropriate for the cell and to enable the desired expression of the transgene.

[00201] The polynucleotides of interest may be obtained, and the nucleotide sequence of the polynucleotides determined, by any method known in the art. For example, if the nucleotide sequence of the antibody is known, a polynucleotide encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (e.g., as described in Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)) and then amplifying the ligated oligonucleotides, for example, by PCR.

[00202] Alternatively, a polynucleotide encoding an antibody may be generated from nucleic acid of a cell expressing same. If a clone containing a nucleic acid encoding a particular antibody is not available, but the sequence of the antibody molecule is known, a nucleic acid encoding the immunoglobulin may be obtained from a suitable source, such as a library, which may be one specific for antibody-producing cells, such as hybridoma cells selected to express an antibody of the invention. Suitable primers can be configured for PCR amplification. Amplified nucleic acids generated by PCR may then be cloned into replicable cloning vectors using any method well known in the art.

[00203] Once the nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the antibody are determined, the nucleotide sequence of the antibody may be manipulated to obtain the equivalents of interest described herein using methods known in the art for manipulating nucleotide sequences, e.g., recombinant DNA techniques, site directed mutagenesis, PCR etc. (see, for example, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); and Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998) to generate antibodies having a different amino acid sequence, for example, to create amino acid substitutions, deletions and/or insertions.

[00204] The amino acid sequence of the heavy and/or light chain variable domain may be inspected to identify the sequences of the CDRs by well known methods, e.g., by comparison to known amino acid sequences of other heavy and light chain variable regions to determine the regions of sequence hypervariability. Using routine recombinant DNA techniques, one or more of the CDRs may be inserted within framework regions, e.g., into human framework regions to humanize a non-human antibody, as described *supra*. The polynucleotide of interest generated by the combination of the framework regions and one or more CDRs encodes an antibody that specifically binds CXCR5, or at least the ED domain thereof. For example, such methods may be used to make amino acid substitutions or deletions of one or more variable region cysteine residues participating in an intrachain disulfide bond to generate antibody molecules lacking one or more intrachain disulfide bonds.

[00205] The antibodies or antibody fragments of the invention can be used to detect CXCR5, and hence cells expressing CXCR5, in a biological sample *in vitro* or *in vivo*. In one embodiment, the anti-CXCR5 antibody of the invention is used to determine the presence and the level of CXCR5 in a tissue or in cells derived from the tissue. The levels of CXCR5 in the tissue or biopsy can be determined, for example, in an immunoassay with the antibodies or antibody fragments of the invention. The tissue or biopsy thereof can be frozen or fixed. The same or other methods can be used to determine other properties of CXCR5, such as the level thereof, cellular localization, mRNA levels, mutations thereof and so on.

[00206] The above-described method can be used, for example, to diagnose a cancer in a subject known to be or suspected to have a cancer, wherein the level of CXCR5 measured in said patient is compared with that of a normal reference subject or standard. The assay of interest also can be used to diagnose arthritis or other autoimmune diseases characterized by B cell infiltration and concentration, along with development of differentiated lymphoid tissue.

[00207] The instant invention further provides for monoclonal antibodies, humanized antibodies and epitope-binding fragments thereof that are further labeled for use in research or diagnostic applications. In some embodiments, the label is a radiolabel, a fluorophore, a chromophore, an imaging agent or a metal ion.

[00208] A method for diagnosis is also provided in which said labeled antibodies or epitope-binding fragments thereof are administered to a subject suspected of having a cancer, arthritis, autoimmune diseases or other CXCR5 disease, and the distribution of the label within the body of the subject is measured or monitored.

[00209] The antibody and fragments thereof of the instant invention may be used as affinity purification agents. In that process, the antibodies are immobilized on a solid phase, such as a dextran or agarose resin or filter paper, using methods known in the art. The immobilized antibody is contacted with a sample containing CXCR5 or cells carrying same to be purified, and thereafter the support is

washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the CXCR5 or cell to be purified, which is bound to the immobilized antibody of interest. Finally, the support is washed with another suitable solvent, such as glycine buffer, pH 5.0, that will release the CXCR5 or cell from the antibody of interest.

[00210] For diagnostic applications, the antibody of interest typically will be labeled with a detectable moiety. Numerous labels are available which can be generally grouped into the following categories: (a) radioisotopes, such as ^{36}S, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H and ^{131}I (The antibody can be labeled with the radioisotope using a techniques described in Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), for example, and radioactivity can be measured using scintillation counting); (b) fluorescent labels, such as rare earth chelates (europium chelates), fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, lissamine, phycoerythrin and Texas Red, the fluorescent labels can be conjugated to the antibody using a technique disclosed in Current Protocols in Immunology, *supra*, for example, where fluorescence can be quantified using a fluorimeter; and (c) various enzyme substrate labels are available (U.S. Pat. No. 4,275,149 provides a review), the enzyme generally catalyzes a chemical alteration of the chromogenic substrate which can be measured using various techniques, for example, the enzyme may catalyze a color change in a substrate, which can be measured spectrophotometrically, or the enzyme may alter the fluorescence or chemiluminescence of the substrate. Techniques for quantifying a change in fluorescence are known, for example, using a luminometer, or the label donates energy to a fluorescent acceptor. Examples of enzymatic labels include luciferases (e.g., firefly luciferase and bacterial luciferase; U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, malate dehydrogenase, urease, peroxidase, such as horseradish peroxidase (HRPO), alkaline phosphatase, β-galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases (e.g., glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), heterocyclic oxidases (such as uricase and xanthine oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase and the like. Techniques for conjugating enzymes to antibodies are

described in O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

[00211] When such labels are used, suitable substrates are available, such as: (i) for horseradish peroxidase with hydrogen peroxidase as a substrate, wherein the hydrogen peroxidase oxidizes a dye precursor (e.g., orthophenylene diamine (OPD) or 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine hydrochloride (TMB)); (ii) for alkaline phosphatase (AP) with p-nitrophenyl phosphate as the chromogenic substrate; and (iii) β-D-galactosidase (β-D-Gal) with a chromogenic substrate (e.g., p-nitrophenyl-β-D-galactosidase) or a fluorogenic substrate such as 4-methylumbelliferyl-β-D-galactosidase.

[00212] Other enzyme-substrate combinations are available to those skilled in the art. For a general review, see U.S. Pat. Nos. 4,275,149 and 4,318,980.

[00213] Sometimes, the label is indirectly conjugated with the antibody. For example, the antibody can be conjugated with biotin and any of the reporters mentioned above can be conjugated with avidin, or vice versa. Biotin binds selectively to avidin and thus, the label can be conjugated with the antibody in that indirect manner. Alternatively, to achieve indirect conjugation of the label, the antibody is conjugated with a small hapten (e.g., digoxin) and one of the different types of labels or reporters mentioned above is conjugated with an anti-digoxin antibody. Thus, indirect conjugation of the label with the antibody or mutein can be achieved using a second antibody.

[00214] In another embodiment of the invention, the antibody need not be labeled, and the presence thereof can be detected using a labeled antibody which binds to the antibody, another form of a second antibody.

[00215] The antibodies of the present invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

[00216] Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard to compete with the test sample for binding with a limited amount of

antibody. The amount of antigen in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies generally are insolubilized before or after the competition. As a result, the standard and test sample that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and test sample which remain unbound.

[00217] Sandwich assays involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, determinant or epitope, of the target to be detected. In a sandwich assay, the test sample to be analyzed is bound by a first antibody which is immobilized directly or indirectly on a solid support, and thereafter a second antibody directly or indirectly labeled binds to the bound test sample, thus forming an insoluble three-part complex, see e.g., U.S. Pat. No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody or other suitable member of the binding pair (antibody/antigen, receptor/ligand, enzyme/substrate, for example) that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assay). For example, one type of sandwich assay is an ELISA assay, in which case the detectable moiety is an enzyme.

[00218] For immunohistochemistry, the cell or tissue sample may be fresh or frozen or may be embedded in paraffin and fixed with a preservative such as formalin, for example.

[00219] The antibodies may also be used for *in vivo* diagnostic assays. Generally, the antibody mutant is labeled with a radionucleotide (such as ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P or ^{35}S) so that the sites expressing CXCR5 can be localized using immunoscintography.

[00220] The instant invention also includes kits, e.g., comprising an antibody, fragment thereof, homolog, derivative thereof and so on, such as a labeled or cytotoxic conjugate, and instructions for the use of the antibody, conjugate for killing particular cell types and so on. The instructions may include directions for using the antibody, conjugate and so on *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*. The antibody can

be in liquid form or as a solid, generally lyophilized. The kit can contain suitable other reagents, such as a buffer, a reconstituting solution and other necessary ingredients for the intended use. A packaged combination of reagents in predetermined amounts with instructions for use thereof, such as for a therapeutic use of for performing a diagnostic assay is contemplated. Where the antibody is labeled, such as with an enzyme, the kit can include substrates and cofactors required by the enzyme (e.g., a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). In addition, other additives may be included such as stabilizers, buffers (e.g., a block buffer or lysis buffer) and the like. The relative amounts of the various reagents may be varied to provide for concentrates of a solution of a reagent, which provides user flexibility, economy of space, economy of reagents and so on. The reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients, which on dissolution provide a reagent solution having the appropriate concentration.

[00221] The antibodies of the present invention may be used to treat a mammal. In one embodiment, the antibody or equivalent of interest is administered to a nonhuman mammal for the purposes of obtaining preclinical data, for example. Exemplary nonhuman mammals to be treated include nonhuman primates, dogs, cats, rodents and other mammals in which preclinical studies are performed. Such mammals may be established animal models for a disease to be treated with the antibody, or may be used to study toxicity of the antibody of interest. In each of those embodiments, dose escalation studies may be performed in the mammal.

[00222] An antibody, with or without a second component, such as a therapeutic moiety conjugated to same, administered alone or in combination with cytotoxic factor(s) can be used as a therapeutic. The present invention is directed to antibody-based therapies which involve administering antibodies of the invention to an animal, a mammal, or a human, for treating a CXCR5-mediated disease, disorder or condition. The animal or subject may be a mammal in need of a particular treatment, such as a mammal having been diagnosed with a particular disorder, e.g., one relating to CXCR5. Antibodies directed against CXCR5 are useful, for example, for prophylaxis or treatment of arthritis, inflammatory diseases, in general, graft

rejection, cancer and autoimmune disorders. For example, by administering a therapeutically acceptable dose of an anti-CXCR5 antibody of the instant invention, or a cocktail of a plurality of the instant antibodies or equivalents thereof, or in combination with other antibodies of varying sources, disease symptoms may be ameliorated or prevented in the treated mammal, particularly humans.

[00223] Therapeutic compounds of the invention include, but are not limited to, antibodies of the invention (including fragments, analogs, equivalents and derivatives thereof as described herein) and nucleic acids encoding antibodies of the invention as described herein (including fragments, analogs and derivatives thereof) and anti-idiotypic antibodies as described herein. The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit or prevent diseases, disorders or conditions associated with aberrant expression and/or activity of CXCR5, including, but not limited to, any one or more of the diseases, disorders, or conditions described herein. The treatment and/or prevention of diseases, disorders or conditions associated with aberrant expression and/or activity of CXCR5 includes, but is not limited to, alleviating at least one symptom associated with those diseases, disorders, or conditions. Antibodies of the invention may be provided in pharmaceutically acceptable compositions as known in the art or as described herein. The term "physiologically acceptable," "pharmacologically acceptable" and so on mean approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals and more particularly in humans.

[00224] The anti-CXCR5 antibody can be administered to a mammal in any acceptable manner. Methods of introduction include, but are not limited to, parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, intranasal, epidural, inhalation and oral routes, and if desired for immunosuppressive treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intradermal, intravenous, intraarterial or intraperitoneal administration. The antibodies or compositions may be administered by any convenient route, for example, by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g.,

oral mucosa, rectal and intestinal mucosa etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the therapeutic antibodies or compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Preferably the dosing is given by injection, preferably intravenous or subcutaneous injections, depending, in part, on whether the administration is brief or chronic.

[00225] Various other delivery systems are known and can be used to administer an antibody of the present invention, including, e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules (see Langer, Science 249:1527 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer; Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); and Lopez-Berestein, ibid., p. 317-327) and recombinant cells capable of expressing the compound; receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)); construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector etc.

[00226] The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coascervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacylate) microcapsule, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980).

[00227] Pulmonary administration can also be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent. The antibody may also be administered into the lungs of a patient in the form of a dry powder composition, see e.g., U.S. Pat. No. 6,514,496.

[00228] In a specific embodiment, it may be desirable to administer the therapeutic antibodies or compositions of the invention locally to the area in need of treatment; that may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion, topical application, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes or fibers. Preferably, when administering an antibody of the invention, care is taken to use materials to which the protein does not absorb or adsorb.

[00229] In yet another embodiment, the antibody can be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (see Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); and Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)). In another embodiment, polymeric materials can be used (see Medical Applications of Controlled Release, Langer et al., eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983); see also Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann Neurol 25:351 (1989); and Howard et al., J Neurosurg 71:105 (1989)). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target.

[00230] Therapeutic formulations of the polypeptide or antibody may be prepared for storage as lyophilized formulations or aqueous solutions by mixing the polypeptide having the desired degree of purity with optional "pharmaceutically acceptable" carriers, diluents, excipients or stabilizers typically employed in the art, i.e., buffering agents, stabilizing agents, preservatives, isotonifiers, non-ionic detergents, antioxidants and other miscellaneous additives, see Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, ed. (1980). Such additives are generally nontoxic to the recipients at the dosages and concentrations employed, hence, the excipients, diluents, carriers and so on are pharmaceutically acceptable.

[00231] An "isolated" or "purified" antibody is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source or

medium from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of an antibody in which the polypeptide/protein is separated from cellular components of the cells from which same is isolated or recombinantly produced. Thus, an antibody that is substantially free of cellular material includes preparations of the antibody having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5% or 1%, (by dry weight) of contaminating protein. When the antibody is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, 5%, 2.5% or 1% of the volume of the protein preparation. When antibody is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals and reagents, i.e., the antibody of interest is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly, such preparations of the antibody have less than about 30%, 20%, 10%, 5% or 1% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than antibody of interest. In a preferred embodiment of the present invention, antibodies are isolated or purified.

[00232] As used herein, the phrase "low to undetectable levels of aggregation" refers to samples containing no more than 5%, no more than 4%, no more than 3%, no more than 2%, no more than 1% and often no more than 0.5% aggregation, by weight protein, as measured by, for example, high performance size exclusion chromatography (HPSEC).

[00233] As used herein, the term "low to undetectable levels of fragmentation" refers to samples containing equal to or more than 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or 99%, of the total protein, for example, in a single peak, as determined by HPSEC, or in two (2) peaks (heavy chain and light chain) by, for example, reduced capillary gel electrophoresis (rCGE) and containing no other single peaks having more than 5%, more than 4%, more than 3%, more than 2%, more than 1% or more than 0.5% of the total protein, each. The rCGE as used herein refers to capillary gel

electrophoresis under reducing conditions sufficient to reduce disulfide bonds in an antibody or antibody-type or derived molecule.

[00234] As used herein, the terms "stability" and "stable" in the context of a liquid formulation comprising a CXCR5 antibody or binding fragment thereof refer to the resistance of the antibody or antigen-binding fragment thereof in the formulation to thermal and chemical unfolding, aggregation, degradation or fragmentation under given manufacture, preparation, transportation and storage conditions. The "stable" formulations of the invention retain biological activity equal to or more than 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% or 99.5% under given manufacture, preparation, transportation and storage conditions. The stability of said antibody preparation can be assessed by degrees of aggregation, degradation or fragmentation by methods known to those skilled in the art, including, but not limited to, rCGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and HPSEC, compared to a reference.

[00235] The term, "carrier," refers to a diluent, adjuvant, excipient or vehicle with which the therapeutic is administered. Such physiological carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a suitable carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions also can be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. The compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations, depots and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulations can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol,

lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate etc. Examples of suitable carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Such compositions will contain an effective amount of the antibody, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. As known in the art, the formulation will be constructed to suit the mode of administration.

[00236] Buffering agents help to maintain the pH in the range which approximates physiological conditions. Buffers are preferably present at a concentration ranging from about 2 mM to about 50 mM. Suitable buffering agents for use with the instant invention include both organic and inorganic acids, and salts thereof, such as citrate buffers (e.g., monosodium citrate-disodium citrate mixture, citric acid-trisodium citrate mixture, citric acid-monosodium citrate mixture etc.), succinate buffers (e.g., succinic acid-monosodium succinate mixture, succinic acid-sodium hydroxide mixture, succinic acid-disodium succinate mixture etc.), tartrate buffers (e.g., tartaric acid-sodium tartrate mixture, tartaric acid-potassium tartrate mixture, tartaric acid-sodium hydroxide mixture etc.), fumarate buffers (e.g., fumaric acid-monosodium fumarate mixture, fumaric acid-disodium fumarate mixture, monosodium fumarate-disodium fumarate mixture etc.), gluconate buffers (e.g., gluconic acid-sodium glyconate mixture, gluconic acid-sodium hydroxide mixture, gluconic acid-potassium gluconate mixture etc.), oxalate buffers (e.g., oxalic acid-sodium oxalate mixture, oxalic acid-sodium hydroxide mixture, oxalic acid-potassium oxalate mixture etc.), lactate buffers (e.g., lactic acid-sodium lactate mixture, lactic acid-sodium hydroxide mixture, lactic acid-potassium lactate mixture etc.) and acetate buffers (e.g., acetic acid-sodium acetate mixture, acetic acid-sodium hydroxide mixture etc.). Phosphate buffers, carbonate buffers, histidine buffers, trimethylamine salts such as Tris, HEPES and other such known buffers can be used.

[00237] Preservatives may be added to retard microbial growth, and may be added in amounts ranging from 0.2%-1% (w/v). Suitable preservatives for use with the present invention include phenol, benzyl alcohol, m-cresol, methyl paraben, propyl paraben, octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride,

benzyaconium halides (e.g., chloride, bromide and iodide), hexamethonium chloride, alkyl parabens such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol and 3-pentanol.

[00238] Isotonicifiers are present to ensure physiological isotonicity of liquid compositions of the instant invention and include polhydric sugar alcohols, preferably trihydric or higher sugar alcohols, such as glycerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol and mannitol. Polyhydric alcohols can be present in an amount of between about 0.1% to about 25%, by weight, preferably 1% to 5% taking into account the relative amounts of the other ingredients.

[00239] Stabilizers refer to a broad category of excipients which can range in function from a bulking agent to an additive which solubilizes the therapeutic agent or helps to prevent denaturation or adherence to the container wall. Typical stabilizers can be polyhydric sugar alcohols; amino acids, such as arginine, lysine, glycine, glutamine, asparagine, histidine, alanine, ornithine, L-leucine, 2-phenylalanine, glutamic acid, threonine etc., organic sugars or sugar alcohols, such as lactose, trehalose, stachyose, arabitol, erythritol, mannitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinisitol, galactitol, glycerol and the like, including cyclitols such as inositol; polyethylene glycol; amino acid polymers; sulfur containing reducing agents, such as urea, glutathione, thioctic acid, sodium thioglycolate, thioglycerol, α-monothioglycerol and sodium thiosulfate; low molecular weight polypeptides (i.e., <10 residues); proteins, such as human serum albumin, bovine serum albumin, gelatin or immunoglobulins; hydrophilic polymers, such as polyvinylpyrrolidone, saccharides, monosaccharides, such as xylose, mannose, fructose, glucose; disaccharides, such as lactose, maltose and sucrose; trisaccharides such as raffinose; polysaccharides such as dextran and so on. Stabilizers are present in the range from 0.1 to 10,000 w/w per part of active protein.

[00240] Additional miscellaneous excipients include bulking agents, (e.g., starch), chelating agents (e.g., EDTA), antioxidants (e.g., ascorbic acid, methionine or vitamin E) and cosolvents.

[00241] The formulation herein also may contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely impact each other. For example, it may be desirable to further provide an immunosuppressive agent. Such molecules suitably are present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

[00242] As used herein, the term "surfactant" refers to organic substances having amphipathic structures, namely, are composed of groups of opposing solubility tendencies, typically an oil-soluble hydrocarbon chain and a water-soluble ionic group. Surfactants can be classified, depending on the charge of the surface-active moiety, into anionic, cationic and nonionic surfactants. Surfactants often are used as wetting, emulsifying, solubilizing and dispersing agents for various pharmaceutical compositions and preparations of biological materials.

[00243] Non-ionic surfactants or detergents (also known as "wetting agents") may be added to help solubilize the therapeutic agent, as well as to protect the therapeutic protein against agitation-induced aggregation, which also permits the formulation to be exposed to shear surface stresses without causing denaturation of the protein. Suitable non-ionic surfactants include polysorbates (20, 80 etc.), polyoxamers (184, 188 etc.), Pluronic® polyols and polyoxyethylene sorbitan monoethers (TWEEN-20®, TWEEN-80® etc.). Non-ionic surfactants may be present in a range of about 0.05 mg/ml to about 1.0 mg/ml, preferably about 0.07 mg/ml to about 0.2 mg/ml.

[00244] As used herein, the term, "inorganic salt," refers to any compound, containing no carbon, that result from replacement of part or all of the acid hydrogen or an acid by a metal or a group acting like a metal, and often are used as a tonicity adjusting compound in pharmaceutical compositions and preparations of biological materials. The most common inorganic salts are NaCl, KCl, NaH_2PO_4 etc.

[00245] The present invention provides liquid formulations of an anti-CXCR5-binding compound or fragment thereof, having a pH ranging from about 5.0 to about 7.0, or about 5.5 to 6.5, or about 5.8 to about 6.2, or about 6.0.

[00246] The instant invention encompasses liquid formulations having stability at temperatures found in a commercial refrigerator and freezer found in the office of a physician or laboratory, such as from about -20° C to about 5° C., said stability assessed, for example, by high performance size exclusion chromatography (HPSEC), for storage purposes, such as for about 60 days, for about 120 days, for about 180 days, for about a year, for about 2 years or more. The liquid formulations of the present invention also exhibit stability, as assessed, for example, by HSPEC, at room temperatures, for a at least a few hours, such as one hour, two hours or about three hours prior to use.

[00247] The term "small molecule" and analogous terms include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid analogues, polynucleotides, polynucleotide analogues, nucleotides, nucleotide analogues, organic or inorganic compounds (i.e., including heterorganic and/or ganometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds.

[00248] Thus, in the case of cancer, for example, the antibodies of the invention may be administered alone or in combination with other types of cancer treatments, including conventional chemotherapeutic agents (paclitaxel, carboplatin, cisplatin and doxorubicin), anti-EGFR agents (gefitinib, erlotinib and cetuximab), anti-angiogenesis agents (bevacizumab and sunitinib), as well as immunomodulating agents, such as interferon α and thalidomide.

[00249] In another embodiment, in the case of rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), a combination therapy can be used comprising a CXCR-binding molecule of interest. For example, a humanized CXCR5 antibody can be dosed with a small molecule, such as a disease modifying antirheumatic drug, including, but not limited to, for example, methotrexate and pyridine synthesis

inhibitors, such as, leflunomide (Mader & Keystone, J Rheum 34 Supp(16-24) 2007, Gaffo et al., Am J Health Syst Pharm 63:2451-2465, 2006).

[00250] Because various forms of a CXCR5-binding molecule of interest can be non-B cell-depleting, the instant molecule can be combined with other drugs having overlapping mechanisms of action to yield an additive or synergistic endpoint. Hence, for example, a second drug can be one which acts at the level of a cytokine, in the T cell axis and so on.

[00251] As used herein, the terms "therapeutic agent" and "therapeutic agents" refer to any agent(s) which can be used in the treatment, management or amelioration of a disease, disorder, malady and the like associated with aberrant CXCR5 and/or CXCL13 metabolism and activity. That can be manifest in abnormal B cell levels or B cell activity. Also included are known compounds with a pharmacologic effect in treating a disorder and so on that is associated with aberrant CXCR5 and/or CXCL13 metabolism and activity.

[00252] In addition, the antibodies of the instant invention may be conjugated to various effector molecules such as heterologous polypeptides, drugs, radionucleotides or toxins, see, e.g., WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. Pat. No. 5,314,995; and EPO 396,387. An antibody or fragment thereof may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin (e.g., a cytostatic or cytocidal agent), a therapeutic agent or a radioactive metal ion (e.g., α emitters such as, for example, ^{213}Bi). A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include paclitaxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracindione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol and puromycin and analogs or homologues thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil and decarbazine), alkylating agents (e.g., mechlorethamine, chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol,

streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin, daunomycin and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin, actinomycin, bleomycin, mithramycin and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).

[00253] Techniques for conjugating such a therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Arnon et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., in Controlled Drug Delivery, 2nd ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985); and Thorpe, et al., Immunol Rev 62:119 (1982). Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate, such as a bifunctional antibody, see, e.g., U.S. Pat. No. 4,676,980.

[00254] The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the therapeutic agent or drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, α-interferon, β-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, an apoptotic agent, e.g., TNF-α, TNF-β, AIM I (WO 97/33899), AIM II (WO 97/34911), Fas ligand (Takahashi et al., Int Immunol, 6:1567 (1994)), VEGF (WO 99/23105); a thrombotic agent; an anti-angiogenic agent, e.g., angiostatin or endostatin; or biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (GCSF) or other growth factors.

[00255] The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. That can be accomplished, for example, by filtration through sterile filtration

membranes. For example, the liquid formulations of the present invention may be sterilized by filtration using a 0.2 μm or a 0.22 μm filter.

[00256] Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films or matrices. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethylmethacrylate), poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers (such as injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer) and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, amino acid substitution and developing specific polymer matrix compositions.

[00257] The antibody, or variant thereof, composition will be formulated, dosed and administered in a manner consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The "therapeutically effective amount" of the antibody or variant to be administered will be governed by such considerations, and can be the minimum amount necessary to prevent, ameliorate or treat a CXCR5 disease, condition or disorder.

[00258] The antibody, or variant thereof, optionally is formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibody present in the formulation, the type of disorder or treatment and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages.

[00259] As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a therapy (e.g., a prophylactic or therapeutic agent), which is sufficient to reduce the severity and/or duration of a CXCR5 disease, ameliorate one or more symptoms thereof, prevent the advancement of a CXCR5 disease or cause regression of a CXCR5 disease, or which is sufficient to result in the prevention of the development, recurrence, onset, or progression of a CXCR5 disease or one or more symptoms thereof, or enhance or improve the prophylactic and/or therapeutic effect(s) of another therapy (e.g., another therapeutic agent) useful for treating a CXCR5 disease. For example, a treatment of interest can reduce elevated B cell levels, based on baseline or a normal level, by at least 5%, preferably at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 100%. In another embodiment, an effective amount of a therapeutic or a prophylactic agent reduces the symptoms of a CXCR5 disease, such as arthritis or graft rejection by at least 5%, preferably at least 10%, at least 15%, at least 20%, at least 25%, at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, or at least 100%. Also used herein as an equivalent is the term, "therapeutically effective amount."

[00260] The amount of therapeutic polypeptide, antibody or fragment thereof which will be effective in the use or treatment of a particular disorder or condition will depend on the nature of the disorder or condition, and can be determined by standard clinical techniques. Where possible, a dose-response curve and the pharmaceutical compositions of the invention can be first derived *in vitro*. If

a suitable animal model system is available, again a dose-response curve can be obtained and used to extrapolate a suitable human dose practicing methods known in the art. However, based on common knowledge of the art, a pharmaceutical composition effective in promoting a diminution of an inflammatory effect, for example, may provide a local therapeutic agent concentration of between about 5 and 20 ng/ml, and, preferably, between about 10 and 20 ng/ml. In an additional specific embodiment of the invention, a pharmaceutical composition effective in ameliorating the growth and survival of cells responsible for B cell-dependent autoimmune manifestations or graft rejection may provide a local therapeutic agent concentration of between about 10 ng/ml and about 100 ng/ml.

[00261] In a preferred embodiment, an aqueous solution of therapeutic polypeptide, antibody or fragment thereof can be administered by subcutaneous injection. Each dose may range from about 0.5 mg to about 50 mg per kilogram of body weight, or more preferably, from about 3 mg to about 30 mg per kilogram body weight. The dosage can be ascertained empirically for the particular disease, patient population, mode of administration and so on, practicing pharmaceutic methods known in the art.

[00262] The dosing schedule for subcutaneous administration may vary from once a week to daily depending on a number of clinical factors, including the type of disease, severity of disease and the sensitivity of the subject to the therapeutic agent.

[00263] The instant invention provides methods for preparing liquid formulations of the antibody or CXCR5-binding fragment thereof, said methods comprising concentrating a fraction of purified antibody to a final concentration of about 15 mg/ml, about 20 mg/ml, about 30 mg/ml, about 40 mg/ml, about 50 mg/ml, about 60 mg/ml, about 70 mg/ml, about 80 mg/ml, about 90 mg/ml, about 100 mg/ml, about 200 mg/ml, about 250 mg/ml, about 300 mg/ml or more using, for example, a semi-permeable membrane with an appropriate molecular weight (mw) cutoff (e.g., 30 K_D cutoff for $F_{(ab')2}$ fragments thereof, and 10 K_D cutoff for F_{ab} fragments) and,

optionally, diafiltering the concentrated antibody fraction into the formulation buffer using the same membrane.

[00264] In addition, the present invention also encompasses stable, such as K_D stable, liquid formulations of the products of interest that have improved half-life *in vivo*. Thus, the antibody of interest has a half-life in a subject, preferably a human, of greater than 3 days, greater than 7 days, greater than 10 days, greater than 15 days, greater than 25 days, greater than 30 days, greater than 35 days, greater than 40 days, greater than 45 days, greater than 2 months, greater than 3 months, greater than 4 months, greater than 5 months or more.

[00265] To prolong the serum circulation of an antibody *in vivo*, various techniques can be used. For example, inert polymer molecules, such as high molecular weight polyethylene glycol (PEG), can be attached to an antibody with or without a multifunctional linker either through site-specific conjugation of the PEG to the N-terminus or to the C-terminus of the antibody or via ε amino groups present on lysine residues. Linear or branched polymer derivatization that results in minimal loss of biological activity can be used. The degree of conjugation can be closely monitored by SDS-PAGE and mass spectrometry to ensure proper conjugation of PEG molecules to the antibodies. Unreacted PEG can be separated from antibody-PEG conjugates by size-exclusion or by ion exchange chromatography. PEG-derivatized antibodies can be tested for binding activity as well as for *in vivo* efficacy using methods known to those of skilled in the art, for example, by immunoassays described herein.

[00266] An antibody having an increased half-life *in vivo* can also be generated by introducing one or more amino acid modifications (i.e., substitutions, insertions or deletions) into an IgG constant domain, or F_cR binding fragment thereof (such as an F_c or hinge F_c domain fragment), see, e.g., WO 98/23289; WO 97/34631; and U.S. Pat. No. 6,277,375.

[00267] Further, an antibody can be conjugated to albumin to make an antibody more stable *in vivo* or have a longer half life *in vivo*. The techniques are known in the art, see e.g., WO 93/15199, WO 93/15200 and WO 01/77137; and EPO

413, 622. The antibody also can be modified, for example, by glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein and so on.

[00268] In one embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lidocaine or other "caine" anesthetic to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water-free concentrate in a sealed container, such as an ampule or sachet indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampule of sterile water for injection or saline can be provided, for example, in a kit, so that the ingredients may be mixed prior to administration.

[00269] The invention also provides that a liquid formulation of the present invention is packaged in a sealed container such as an ampule or sachet indicating the quantity of the product of interest. The liquid formulations of the instant invention can be in a sealed container indicating the quantity and concentration of the antibody or antibody fragment. The liquid formulation of the instant invention can be supplied in a sealed container with at least 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, or 300 mg/ml of CXCR5 antibody in a quantity of 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml or 20 ml, for example.

[00270] An article of manufacture containing materials useful for the treatment of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles,

vials, syringes and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for diagnosing, preventing or treating a CXCR5 condition or disease and may have a sterile access port (for example, the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The label on or associated with the container indicates that the composition is used for treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including buffers, diluents, filters, needles, syringes and package inserts with instructions for use.

[00271] In another aspect of the invention, nucleic acids comprising sequences encoding antibodies or functional derivatives thereof, are administered to treat, inhibit or prevent a disease or disorder associated with aberrant expression and/or activity of CXCR5, by way of gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration to a subject of an expressed or expressible nucleic acid of interest. In the embodiment of the invention, the nucleic acids produce the encoded protein in and by target host cells that mediate a therapeutic effect. Any of the methods for gene therapy available can be used according to the instant invention.

[00272] For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488 (1993); Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991); Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573 (1993); Mulligan, Science 260:926 (1993); Morgan et al., Ann Rev Biochem 62:191 (1993); and May, TIBTECH 11:155 (1993).

[00273] In one aspect, the compound comprises nucleic acid sequences encoding an antibody, or functional binding fragments thereof, said nucleic acid sequences being part of expression vectors that express the antibody or fragments or chimeric proteins or heavy or light chains thereof in a suitable host. In particular, such nucleic acid sequences have promoters operably linked to the antibody coding region,

said promoter being inducible or constitutive, and, optionally, tissue-specific, as well as other regulatory sequences.

[00274] In another particular embodiment, nucleic acid molecules are used in which the antibody coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the antibody-encoding nucleic acids (Koller, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:8932 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435 (1989)). In specific embodiments, the expressed antibody molecule is a single chain antibody; alternatively, the nucleic acid sequences include sequences encoding both the heavy and light chains, or fragments thereof, of the antibody. Alternative methods for integration include using particular transcription factors that recognize specific nucleic acid sequences, zinc fingers and so on.

[00275] Delivery of the nucleic acids into a patient may be either direct, in which case the patient is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying vectors, or indirect, in which case, cells are first transformed with the nucleic acids *in vitro*, then transplanted into the patient.

[00276] In one embodiment, the nucleic acid sequences are directly administered *in vivo* and is expressed to produce the encoded product. That can be accomplished by any of numerous methods known in the art, e.g., by constructing the antibody encoding sequences as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering same so that the vectors become intracellular, e.g., by infection using defective or attenuated retrovirals or other viral vectors (see U.S. Pat. No. 4,980,286), by direct injection of naked DNA, by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic, Dupont), using non-viral vectors, such as synthetic compositions comprising an amphipathic compound that binds the hydrophilic nucleic acid and has the ability to fuse with cells, generally thus containing a hydrophobic portion for combining with membranes, coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, by administering the vector in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus, by administering the vector in linkage to a ligand subject to

receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)) (which can be used to target cell types specifically expressing the receptors) etc. In another embodiment, nucleic acid-ligand complexes can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell-specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, e.g., WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188 and WO 93/20221).

[00277] Regarding vectors, for example, a lentiviral vector can be used as known in the art. The lentiviral vectors contain components for packaging the viral genome and integration into the host cell DNA. The nucleic acid sequences encoding the antibody to be used in gene therapy are cloned into one or more vectors, which facilitate the delivery of the gene into a patient. For example, a lentiviral vector can be used to deliver a transgene to hematopoietic stem cells. References illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., J Clin Invest 93:644 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467 (1994); Salmons et al., Human Gene Therapy 4:129 (1993); and Grossman et al., Curr Opin Gen and Dev 3:110 (1993).

[00278] Adenoviruses also may be used in the instant invention. Targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells and muscle, for example. Adenoviruses infect non-dividing cells, an advantage over early retroviral vectors. Kozarsky et al., Curr Opin Gen Dev 3:499 (1993) present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3 (1994) demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., Science 252:431 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143 (1992); Mastrangeli et al., J Clin Invest 91:225 (1993); WO94/12649; and Wang et al., Gene Therapy 2:775 (1995).

[00279] Adeno-associated virus (AAV) also can be used in gene therapy (Walsh et al., Proc Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); and U.S. Pat. Nos. 5,436,146; 6,632,670; and 6,642,051).

[00280] Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate-mediated transfection or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells then are placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells then are delivered to a patient.

[00281] Thus, the nucleic acid can be introduced into a cell prior to administration *in vivo* of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see, e.g., Loeffler et al., Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen et al., Meth Enzymol 217:618 (1993); and Cline Pharm Ther 29:69 (1985)) and may be used in accordance with the present invention, provided that the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressed by the cell, heritable and expressed by the cell progeny.

[00282] The resulting recombinant cells can be delivered to a patient by various methods known in the art. Recombinant blood cells (e.g., hematopoietic stem or progenitor cells) are preferably administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, patient state etc., and can be determined by one skilled in the art.

[00283] Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include, but are not limited to, epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes, blood cells, such as T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes and granulocytes; various

stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, e.g., as obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood, fetal liver etc.

[00284] In one embodiment, the cell used for gene therapy is autologous to the patient. Nucleic acid sequences encoding an antibody of the instant invention are introduced into the cells such that the transgene is expressed by the cells or their progeny, and the recombinant cells then are administered *in vivo* for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem and/or progenitor cells which can be isolated and maintained *in vitro* can potentially be used in accordance with the embodiment of the instant invention (see e.g., WO 94/08598; Stemple et al., Cell 71:973 (1992); Rheinwald Meth Cell Bio 21A:229 (1980); and Pittelkow et al., Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)). Because CXCR5 is expressed on, for example, B cells, blood cells and bone marrow cells are suitable host cells. However, the scope of the instant invention regarding the use of stem cell hosts does not contemplate the making and using of a transgene to make a transgenic organism by administering the transgene of interest to embryos and embryonic stem cells.

[00285] The invention provides methods of treatment, prophylaxis and amelioration of CXCR5 diseases or one or more symptoms thereof by administrating to a subject of an effective amount of, for example, a liquid formulation of the invention. The subject is preferably a mammal such as non-primate (e.g., cows, pigs, horses, cats, dogs, rats etc.) and a primate (e.g., monkey, such as a cynomolgus monkey, and a human). In a preferred embodiment, the subject is a human.

[00286] CXCR5 also is expressed on certain cancer cells, such as pancreas, colon and bladder, as well as on T cell leukemias (Qinping et al., Oncogene 24:573-584, 2005), and B cell leukemias (Burkel et al., Blood, Jul 2007; doi:10.1182/blood-2007-05-089409) and stimulation of CXCR5 correlated with proliferation of carcinoma cells, Meijer et al., Canc Res 66:9576-9582, 2006.

[00287] Thus, the antibody or derivative thereof of interest can be used to control proliferation of cancer cells expressing CXCR5, which cancers are identified by determining presence of CXCR5 expression by a diagnostic assay taught

herein. The antibody of interest can reduce infiltration of malignant cells, reduce resistance to apoptosis and minimize proliferation. Such patients then are administered a cancer cell proliferation inhibiting amount of an antibody, or derivative thereof, of interest as provided herein.

[00288] Autoinmune disorders are associated with aberrant and/or high expression of CXCL13, such as lupus (Ishikawa et al., J Exp Med 193:1393-1402, 2001) and Sjoren's Syndrome (Salomonsson et al., Scan J Imm 55:336-342, 2002; and Barone et al., Arth Rheum 52(6)1773-1784, 2005), or high expression of CXCR5, such as in myasthenia gravis (Sims et al., J Imm 167:1935-1944, 2001; Saito et al., J Neuroimm 55:336-342, 2005; and Tackenberg et al., Eur J Imm 37:849-863, 2007). Hence, an antibody of interest is used to minimize the effect of high levels or high activity of CXCL13 or CXCR5 ligand. In autoimmune disorders characterized by high levels of B cells, high levels of CXCR5 or high levels of CXCL13, or other CXCR5 ligand, a B cell activity inhibiting amount of an antibody of interest is administered as taught herein.

[00289] Aberrant CXCR5 expression is observed in multiple sclerosis, Brain 129(Pt 1)200-211, 2006.

[00290] In colitis, CXCR5 has a role in GALT formation and function (Carlsen et al., Gut, 2002, 51(3)364-367). CXCR5-mediated migration and infiltration of B cells into the gut lamina propria, and mucosal infiltration in general, (Mazzucchelli et al., J Clin Invest, 1999, 104(10)R49-R54) and expression thereof in ulcerative colitis lesions which contain ectopic germinal centers, is inhibited by an antibody of interest.

[00291] B cell depletion can be of therapeutic benefit in ameliorating symptoms under certain circumstances and in certain indications, such as, in rheumatoid arthritis (Oligino & Dalrymple, Arth Res Ther 5(Suppl 4)S7-S11, 2003). CXCR5 is expressed at high levels in the synovial tissue of arthritis patients, as compared to tissue from individuals not afflicted with rheumatoid arthritis (Schmutz et al., Arth Res Ther 7:R217-R229, 2005). Thus, certain forms of the instant antibody, and derivatives thereof, can deplete B cell populations, and can prevent

infiltration and interaction of B cells in a joint. Accordingly, a treatment can include administering a B cell level reducing amount of an antibody of interest to a patient diagnosed with arthritis. The antibody can be administered locally to the affected joint.

[00292] Ectopic lymphoid neogenesis is observed in several conditions, including psoriatic arthritis (Canete et al., Ann Rheum Dis, Jan 12, 2007, doi:10:1136/ard.2006.062042), chronic inflammatory diseases, in general (Aloisi & Pujol-Borrell, Nat Rev Imm 6:205-217, 2006) and in grafts undergoing rejection, both chronic (Baddoura et al., Am J Trans 5:510-516, 2005) and acute (DiCarlo et al., Am J Trans 7:201-210, 2007). CXCL13 and CXCR5 were present in cardiac grafts (DiCarlo et al., *supra*); and CXCL13 was present in psoriatic arthritis (Canete et al., *supra*). Presence of CXCL13 and/or CXCR5 is associated with the development of the ectopic lymphoid follicles with B cell and T cell areas, as found in normal nodes. B cell antigen presentation of alloantigen also was associated with acute cardiac allograft model (Noorchashm et al., J Imm 177:7715-7722, 2006).

[00293] Thus, an antibody of interest can be used to dampen inflammation and graft rejection. A patient then is administered a B cell activity inhibiting amount of an antibody to dampen inflammation, to minimize ectopic germinal center development, to minimize B cell recruitment to a graft and to minimize B cell alloantigen presentation before or following a transplantation procedure.

[00294] The invention now will be exemplified for the benefit of the artisan by the following non-limiting examples that depict some of the embodiments by and in which the instant invention can be practiced.

EXAMPLES

EXAMPLE 1: GENERATION OF IMMUNOGEN

[00295] Anti-CXCR5 monoclonal antibodies can be raised to CHO cells transformed with DNA encoding full-length human CXCR5 and expressed on the cell surface ("r-CXCR5-CHO cells"). The CXCR5 sequence used to transform the cells

[00296] The CXCR5 open reading frame was placed into an expression vector, such as pCDNA3.1neo_DEST, and then transfected into 300-19 cells (Immunogen).

[00297] Also, the CXCR5 EC domain, with the amino acid sequence, MNYPTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNTSLVENHLC (SEQ ID NO:1), was conjugated to KLH by the C terminal cysteine , and was used as immunogen. Cells expressing CXCR5 or the CXCR5 EC domain were administered IP (5×10^6 cells in 0.2 ml or 50 µg peptide in 100 µl of buffer, optionally mixed with 100 µl of adjuvant, such as Freund's complete adjuvant). Injections with the antigen were repeated every two weeks until high titer CXCR5 antibody was detected in the serum using any of a variety of known methods, for example, by ELISA or FACS using, for example, $CXCR5^+$ cells, which can be isolated, for example by FACS, and, for example, the commercially available MAB190 (R & D Systems) as a positive control.

[00298] The cells expressing CXCR5 were maintained at 37°C. under 5% CO_2 in RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen). Cells were prepared for injection by substituting the above culture medium with phosphate-buffered (Ca/Mg-free) saline (CMF-PBS) supplemented with 5 mM EDTA, and harvesting the cells in that buffer. The harvested cells were pelleted by centrifugation at 500 x g for about 5 minutes, washed once by resuspending the pellet in CMF-PBS and centrifuging as before, counted, and adjusted to the appropriate volume (such as 5×10^6 cells in 0.2 ml) for injection by resuspending the cell pellet in CMF-PBS.

[00299] As mentioned, CXCR5 expression was monitored, for example, by FACS analysis, using commercially available CXCR5 antibodies, such as MAB190 (R & D), clone RF8B2 and 2G8 (2G8 is an rat anti-mouse CXCR5 antibody, while the other purchased antibodies are anti-human CXCR5 antibodies) (BD), and 2C1 (Abnova), as well as various polyclonal antibodies directed to hCXCR5 made practicing methods known in the art.

[00300] To facilitate the plasmid construction and to enhance the expression of CXCR5, oligonucleotides corresponding to the leader peptide sequence comprising the first 135 base pairs of the CXCR5 nucleic acid coding sequence were generated. The oligonucleotides contained some changes in the wobble coding positions to lower the GC content. All nucleotide sequence changes were silent, i.e., no amino acid sequence changes resulted. After annealing the oligonucleotides together, the engineered leader peptide coding sequence was linked to the rest of the coding sequence by PCR-SOE (Ho et al., Gene 77:51 (1989); and Horton et al., BioTechniques 8:528 (1990)).

[00301] Expression of CXCR5 was verified prior to use as immunogen. Cells are cultured in RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% FBS, 0.2 mM of glutamine and 1 x non-essential amino acid solution followed by seeding about 3-5 x 10^5 cells per well in a T75 flask and grown for approximately 24-48 hours.

[00302] The transformed or transfected cells were cultured for about two weeks until the cells not carrying CXCR5 expression plasmid were eliminated by antibiotic selection. Cells of the stable cell lines can be lysed, proteins obtained and subjected to Western blot analysis.

[00303] Stable or transient transfected cells were assayed for expression of CXCR5 using methods for detecting cell surface expression of CXCR5, such as by FACS analysis. Alternatively, cells can be lysed and the proteins studies, for example, by Western blot analysis. Transfected cells harvested from culture dishes were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in deionized water, mixed with an equal volume of 2 x protein sample loading buffer (BioRad, Hercules, CA) and then heated at about 100° C for 10 minutes. Membrane protein was analyzed using conditioned medium mixed with an equal volume of 2 x protein sample loading buffer and heated at 100° C for 10 minutes. The samples were separated using 4-12% gradient SDS-PAGE. The proteins were transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (BioRad, Hercules, CA), which was blocked with 5% nonfat dry milk in PBST (PBS with 0.05% TWEEN-20®) for at least one hour prior to transfer of protein.

[00304] CXCR5 was detected by incubating the membrane with CXCR5-specific primary antibody in blocking buffer for at least an hour at room temperature, with shaking. The membrane was washed at least three times and a reporter-conjugated secondary antibody in blocking buffer was added to the membrane and incubated for at least one hour at room temperature, with shaking. The membrane was washed three times in PBST and developed with, for example, a chemiluminescent substrate.

EXAMPLE 2: GENERATION OF ANTI-CXCR5 mABS

[00305] A/J or BALB/cJ mice, about 4-6 weeks old (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) were immunized with the CXCR5-transfected cells or an EC peptide. A group of mice were primed intraperitoneally on day 0 with a 1:1 emulsion of KLH-conjugated peptide mixed with adjuvant (CFA), boosted ip on day 20 with the peptides with IFC (incomplete Freund's adjuvant) and/or cells in PBS without adjuvant, and finally boosted intravenously on day 44 with the KLH-peptides mixed in IFC and/or cells in PBS, without adjuvant. Another group of mice were primed ip on day 0, boosted ip on days 15, 39, 53 and 67, and finally boosted intravenously on day 81 (all injections with cells in PBS, without adjuvant). For both groups of mice, each injection contained approximately 3 $x10^6$ to 2 x 10^7 cells in a volume of approximately 200 µl. Alternatively, peptide and/or cell immunizations were performed once every two weeks, 3-6 times until a desirable anti-CXCR5 titer was obtained, as ascertained, for example, by FACS analysis or ELISA.

[00306] Three days after the last injection, the mice, optionally were tested for anti-CXCR5 antibody titer in serum, were sacrificed and the spleen was removed and placed in approximately 10 ml of serum-free DMEM (Gibco) in a Petri dish. The splenocytes were teased out of the capsule using forceps and washed twice in 10 ml of serum-free IMDM (Cellgro, Herndon, VA) at 37°C. The spleen cell suspensions were transferred to a 15 ml conical bottom tube and debris allowed to settle for about 2-5 minutes. The supernatant containing the splenocytes was

transferred to a fresh 15 ml conical bottom tube and washed three more times with IMDM until the fusion. The spleen cells from mice can be pooled.

[00307] Optionally, a 5 ml single cell suspension of control spleen feeder cells was prepared from an unimmunized mouse essentially as described above for the immunized spleen cells and placed in an incubator (37° C, 5% CO_2) until needed.

[00308] The fusion partner for the immunized spleen cells can be a hypoxanthine/aminopterin/thymidine (HAT)-sensitive, non-secreting myeloma cell line, such as P3X63-AG8.653 or SP2/0 (ATCC, Manassas, VA) or FO_B lymphoblasts (ATCC, CRL-1646)). Prior to the fusions, the lymphoid cells were maintained in IMDM/10% FBS (37°C, 7% CO_2) ensuring that the cells are in logarithmic growth phase on the day of the fusion. An alternative selection mechanism relies on using azaserine, which typically is added one day after fusion.

[00309] The fusion protocol used is a hybrid of the protocols set forth in Lerner (Yale J Biol Med, 1981, 54(5)387-402) and Gefter et al. (Somatic Cell Genet, 1977, 3(2)231-236). Before the fusion, the pooled spleen cells were washed three times with serum-free IMDM, and counted. Also, immediately before fusion, the logarithmic phase myeloma cells were washed three times with serum-free IMDM and counted. The lymphoid cells were resuspended to 1 x 10^7 cells/ml in serum-free IMDM. For each fusion, 1-1.5 x 10^8 spleen cells were mixed with 1-3 x 10^7 myeloma cells in a 50 ml conical bottom polypropylene tube, and the cells were washed once with serum-free IMDM. The ratio of spleen cells to myeloma cells was 5:1. The tubes were centrifuged at 500 x g for 10 minutes to pellet the cells. After aspiration of the supernatants, the pellets were resuspended gently by tapping the bottom of the tubes. The tubes then were placed in a beaker of 37° C water. All subsequent fusion steps were carried out in that beaker.

[00310] Next, 1 ml of polyethylene glycol 1500 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) preheated to 37°C was added slowly to each cell pellet over the course of about 1 minute, while gently rocking the tube. The cells were incubated in the PEG for about one minute followed by addition of one ml serum-free IMDM

added dropwise to each pellet over the course of 30 seconds, and then 9 ml serum-free IMDM were added to each pellet over the next minute. Both tubes were centrifuged at 500 x g for 10 minutes at room temperature, and the supernatants were aspirated. The cell pellet was resuspended in 100 ml of filtered complete hybridoma production media (500 ml IMDM (Cellgro) mixed with 10% FBS (SeraCare, Millford, MA), 0.2 mM of L-glutamine, 1x non-essential amino acid solution, 1 mM sodium pyruvate, 0.01% pen-strep (Invitrogen) and 1X HT supplement (Invitrogen)).

[00311] Each 100 ml cell suspension was plated in ten 96-well flat-bottom microtiter plates, with a volume of ~100 µl/well. The plates were kept in an incubator at 37°C., 7% CO_2. On day 2 post-fusion, the cells were selected by addition of 5.7 µM azaserine in IMDM to the fused cells at 100 µl per well. Supernatants were withdrawn for primary screening, typically on days 10-14 post-fusion, from wells containing clones. The fusion efficiency was 75-99% (720-950 out of 960 possible wells developed clones that were screened).

[00312] The primary screen can be a radioimmunoassay (RIA) designed to detect antibodies that bind to human CXCR5. To perform the RIA, affinity-purified goat anti-mouse IgG (F_c fragment-specific) (Cappell, Cochranville, PA) in PBS is added to 96-well PVC microtiter plates (50 µl/well) and incubated overnight at 4°C. The goat anti-mouse IgG is removed from the plates and the wells are blocked with 100 µl/well of 5% FCS/PBS for 1 hour at room temperature. After removing the blocking solution, neat hybridoma culture supernatant is added to the wells (50 µl/well) and incubated 1 hour at room temperature. The plates are washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20. Next, 50 µl ^{125}I-CXCR5 (~20,000 cpm) in PBS/5% FCS are added to each well, and incubated 1 hour at room temperature. Finally, the wells are washed 3 times with PBS/0.05% Tween-20. After flicking out all the wash buffer, the wells are separated by cutting the plates and analyzed in a gamma counter. Wells to which 5% FCS/PBS is added instead of culture supernatant served as background wells.

[00313] The purified CXCR5 is labeled with ^{125}I according to the Bolton-Hunter method, substantially as described by the supplier of the Bolton-

Hunter reagent (New England Nuclear, Boston, MA). The quality of the ^{125}I-CXCR5 is monitored by confirming that the labeling procedure did not destroy the epitopes recognized by commercially available CXCR5 antibodies (R & D or Becton Dickinson, Mountain View, CA).

[00314] Clones are considered to be positive on primary screening if supernatant samples are labeled approximately 10-fold over background in the RIA. Positive clones are pulled, expanded and stored frozen.

[00315] A primary hybridoma screen was designed to determine whether the antibodies recognized native CXCR5 epitopes. That was accomplished by FACS analysis of cell surface CXCR5 displayed on CXCR5$^+$ cells stained with the monoclonal antibodies, visualizing binding with fluorescently labeled goat anti-mouse second antibody. Clones were considered to be positive on primary screening if supernatant samples were labeled approximately 10-fold over background in the FACS analysis. Also, to localize the CXCR5 epitopes bound by antibodies, competition assays with CXCR5 antibodies were conducted. Positive clones were selected, expanded and stored frozen.

EXAMPLE 3: CELL-BASED BINDING ASSAYS FOR ANTI-CXCR5 mABS

[00316] A cell-based binding assay was used to characterize the anti-CXCR5 mAbs. For example, the CXCR5-expressing transfected cells described above, such as hCXCR5/HEK293, can be used. A full-length human CXCR5 open reading frame was cloned into a vector, for example, pCDNA3.1neo DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). The CXCR5-coding region was synthesized by RT-PCR using human brain and liver RNA (Ambion, Inc., Austin, TX) as a template. The final plasmid construct, CXCR5/CDNA3.1neo, expressed a full-length CXCR5 protein. A stable cell line expressing CXCR5 was generated by transfection of CXCR5/pCDNA3.1neo plasmid construct into CHO or HEK293 cells (ATCC No. CRL-1573) using a standard and commercially available Lipofectamine 2000 kit. After transfection, the cells were cultured in DMEM overnight, then reseeded in

medium with 200 μg/ml neomycin and cultured for 12-14 days. Isolated single colonies were picked and grown in separate wells until enough clonal cells were amplified. Stable clones resistant to neomycin and which expressed high levels of CXCR5 protein were identified by FACS analysis using polyclonal anti-CXCR5 antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN) or custom generated polyclonal antibodies.

[00317] Human HS Sultan cells (ATCC No. CRL-1484) naturally expressing CXCR5 were also confirmed for CXCR5 expression by FACS analysis. HS Sultan cells were grown in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum, 0.2 mM of glutamine and 0.1% pen/strep solution (100 μg/ml penicillin and 10 μg/ml streptomycin).

[00318] Cell-based antibody-binding can be assessed using the FMAT™ (fluorescence macro-confocal high-throughput screening) 8100 HTS or 8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the protocol provided by the manufacturer. Cell lines naturally expressing CXCR5 or stably transfected with CXCR5 expression constructs are seeded in 96-well plates. Alternatively, transiently transfected 293T or CHO cells are seeded in the 96-well plate. The cells are seeded at a density of 5,000-30,000 cells per well. After 20-24 hours, anti-CXCR5 mAbs and FMAT-conjugated goat anti-mouse IgG antibody are added together to the wells and incubated for 1h, 2h, 4 hr or overnight at room temperature.

[00319] Cell-based antibody-binding was also assessed by FACS using a HEK293/CXCR5 stable cell line expressing CXCR5. Cells were incubated with anti-CXCR5 mAbs in PBS. After three washes, the cells were incubated with fluorescent molecule-conjugated secondary antibody (BD Sciences, Palo Alto, CA).

[00320] The results indicated that several mAbs bind to CXCR5 expressed from either recombinant plasmid constructs. For example, clones 11D6, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6, 79B7 and 16D7, as well as humanized variants of the latter antibody, 16D7, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC1-LC1 and 16D7-HC2-LC1, a negative control IL13 antibody, CA13, positive controls,

MAB190, 2C1 and RF8B2, three mouse isotype controls to IgG1, IgG2a and IgG2b and a rat IgG2b isotype control (matched to RF8B2), were tested for binding to HEK293 cells transfected to express CXCR5. The 2C1 and MAB190 positive control antibodies bind to the CXCR5 cells. RF8B2 presented with intermediate binding levels. The negative control antibodies exhibited only background binding. All antibodies except for CA13 bound to the hCXCR5/HEK293 cells with similar binding profiles and titration kinetics as the parent antibody 16D7 and with 79B7.

[00321] Transiently transfected HEK293 cells containing a CXCR5/neo plasmid are also stained with immunofluorescence as described above and observed by fluorescent microscopy. The cell-based FMAT and FACS analyses confirm that mAbs indeed bind to CXCR5 expressed either from recombinant plasmid constructs or as native protein in cultured cells. A positive binding signal is determined based on the FMAT signal read-out that is significantly higher than background binding and other negative hybridoma clones ($p > 0.01$).

[00322] The CXCR5 mAbs generated, such as 16D7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6 and 79B7, bind to the EC domain and block binding of CXCL13 to CXCR5 on the cell.

EXAMPLE 4: BIACORE AFFINITY ANALYSIS

[00323] The N-terminal EC region of CXCR5 (amino acids 1-59) from human and mouse were synthesized with a terminal biotin tag, and used in a forward format Biacore assay where the peptides were immobilized on a Biacore chip and then the kinetics of antibody interaction with the peptides on the chip were determined. The synthetic peptides were immobilized on a Biacore chip for approximately 20 response units (RUs'). Then the mAb's were exposed to the chip for kinetic measurements, following the manufacturer's recommendations (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[00324] Mouse anti-hCXCR5 mAb clone, 16D7, had a calculated K_D of 2.16^{-12} M; mouse/human IgG4 chimeric 16D7 (16D7 VH and VL regions grafted onto a human IgG4 Fc, the sequence of which is known in the art, optionally codon

optimized, using standard methods, such as cloning, amplification of ends, ascertaining the mass of the regions and cloning the portions) had a K_D of 1.41^{-12} M; and for various humanized variants of 16D7, wherein the structure of the variants and the derivation of the heavy and light chains thereof is denoted by the terms, "HC_" for a particular heavy chain and "LC_" for a particular light chain, which are grafted onto an IgG4 backbone, where the composition of the chains is provided hereinbelow, 16D7-HC1-LC1 had a K_D of 3.11^{-12} M; 16D7-HC1-LC2 had a K_D of 1.41^{-12} M; 16D7-HC2-LC1 had a K_D of 2.40^{-12} M; 16D7-HC1-LC3 had a K_D of 1.21^{-12} M; 16D7-HC3-LC4 had a K_D of 4.92^{-12} M; 16D7-HC3-LC5 had a K_D of 1.84^{-10} M; and 16D7-HC1-LC6 had a K_D of 9.17^{-11} M.

[00325] Humanized SAR113244, a form of the 16D7 humanized variant, 16D7-HC1-LC3 that carries the S241P and L248E substitutions (substitutions introduced practicing known methods and reagents, using Kabat numbering), was captured on a Biacore chip by pre-immobilized mouse anti-human IgG Fc antibody, and then used in a reverse assay format Biacore assay where the kinetics of the un-tagged human CXCR5 N-terminal peptide (amino acids 1--59) interaction with the mAb's on the chip were determined. The K_D for SAR113244 was determined to be 1.13 ± 0.08^{-11} M. The K_D values determined with the forward assay using biotinylated human peptide immobilized on the chip surface and SAR113244 as analyte, were consistent with those obtained using the reverse assay.

EXAMPLE 5: WESTERN BLOT ANALYSIS OF ANTI-CXCR5 MABS BINDING ACTIVITY

[00326] Western blot was performed to assess the anti-CXCR5 mAb binding activity to CXCR5 under denaturing condition, as well as, expression levels of CXCR5 and other CXCR5-related protein in human cell lines. Protein samples also were prepared from stably transfected cells using M-PER mammalian protein extraction reagent kit (Pierce, Rockland, IL, Cat # 78501) following manufacturer's instructions, and heated at 70° C for 10 minutes after adding an equal volume of 2 x protein sample loading buffer. All samples were separated by electrophoresis in a 4-

12% gradient SDS-PAGE gel. The proteins were transferred from the gel to a PVDF membrane and anti-CXCR5 mAbs were applied to the Western blot membrane as the primary detection antibody. An Alexa 680-conjugated secondary antibody was used for detection and the membranes were scanned using the Odyssey Infrared Imaging system (Li-cor, Lincoln, Nebraska) or using electrochemiluminescence (ECL). Positive control antibodies against human CXCR5 were generated as taught herein.

EXAMPLE 6: FACS ASSAY FOR MONITORING CXCR5 INTERNALIZATION

[00327] Buffy coat cells are obtained from healthy volunteers (Gulf Coast Blood Center, Houston, TX). Human peripheral mononuclear cells (PBMCs) are isolated with a standard Ficoll-Hypaque gradient method. PBMCs are cultured (0.5×10^6 cells/well) in 96-well plate at 4°C. Each well contains 0.2 ml of RPMI 1640 supplemented with 10% FBS in the presence/absence of monoclonal antibodies (10 μg/ml). After 30 minutes, the medium is replaced with fresh, cold RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and no antibodies. The cells are transferred to a 37° C humidified tissue culture chamber containing 5% CO_2. Monoclonal antibody-treated cells are harvested immediately, 2 hr or 24 hr after transferring the cells to 37°C. Cells are washed once with PBS and incubated in cold PBS containing 1% BSA (PBSB) for 30 minutes. Cells then are stained with PE-conjugated anti-human CXCR5 (BD Biosciences). After 30 minutes, cells are washed 3 times with PBSB and fixed in 1% paraformaldehyde solution overnight. The next day, presence of CXCR5 is analyzed with a BD FACSCalibur™ system flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

EXAMPLE 7: FLIPR ASSAY

[00328] Changes in intracellular calcium were measured by plating 9000 cells/well and incubating overnight. The cells were the RBL-2H3 line stably transfected with human CXCR5. Cells then were washed and then loaded with 2 mM fluo-4/AM (Molecular Probes) in a buffer containing 2.5 mM probenicid. Cells were

exposed to CXCR5 mAb then washed with assay buffer. The cells were exposed to 10 nM CXCL13 (R & D). Changes in intracellular Ca^{+2} were recorded using the 384-B FLIPR device (Molecular Devices). Commercially available anti-human CXCR5 mAbs, and mouse IgG1 and IgG2b were used as controls.

[00329] As discussed herein below, several humanized versions of mAb 16D7 were constructed, such as chimeric 16D7 (the $hIgG_4$ chimera), 16D7-HC1-LC1, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC2-LC1, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC3-LC4, 16D7-HC3-LC5 and 16D7-HC1-LC6, and they were tested for biological activity as evidenced by calcium flux.

[00330] The humanized antibodies, aside from a negative control, CA13, demonstrated signal neutralizing activity equal to that of the parent 16D7 antibody on transfected cells stably expressing CXCR5.

EXAMPLE 8: CHEMOTAXIS ASSAY

[00331] $CXCR5^+$ HS Sultan cells (ATCC CRL1484) were added to the upper chamber of a transwell plate (Millipore) at 0.5×10^6 cells/well in the presence of 100 nM CXCL13 (R & D) or CTX buffer (RPMI without phenol red, containing 1% FBS, 0.5% BSA and 1 nM Na pyruvate) and migrating cells to the lower chamber were assessed. The two chambers were assembled and incubated for two hours. Cells in the lower chamber were counted after adding colorimetric reagent (Promega) and reading at OD_{490}.

[00332] CXCR5 specific migration was determined as the difference between the total number of migrated cells and the number of spontaneously migrating cells. If an anti-CXCR5 is tested, the cells are incubated with the antibody for 30 minutes prior to adding to the upper chamber. The degree of antibody inhibition is the ratio of the specific migration in the presence of antibody to the amount of migration in the absence of antibody. That ratio can be multiplied by 100% to yield a percent inhibition metric.

[00333] The antibodies of Example 7 were compared to the parent 16D7 antibody for the ability to neutralize chemotaxis. All of the humanized

antibodies aside from negative control mAb CA13, neutralized chemotaxis in a profile comparable to that of 16D7 and 79B7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6. R&D MAB190 had intermediate activity while H28 and Abnova antibody 2C1 did not completely neutralize ligand-induced cell migration.

EXAMPLE 9: PRIMARY HUMAN B CELL REACTIVITY ASSAY

[00334] Human PBMCs were isolated from whole blood using Accuspin columns (Sigma). PBMCs then were resuspended in BD Stain buffer (Becton Dickinson) at 20 million cells/ml. One µg of mouse anti-human CXCR5 monoclonal antibody was added to 50 µl PBMCs and allowed to bind for 20 minutes at 4° C. Cells were washed two times with BD Stain buffer. Fifty µl of the second antibody, goat-anti-mouse IgG-PE $F_{(ab')}$ (Beckman Coulter) diluted 1/100, were added to the PBMC-antibody cocktail and allowed to bind for 20 minutes at 4° C. Cells were washed three times with BD Stain buffer. A cocktail containing mouse anti-human CD20-FITC (BD) and CD4-APC (BD) at 1/50 dilution, each was added to the cells, which then were incubated for 20 minutes at 4° C to assess B/T cell specificity. Cells were washed 3 times with BD Stain buffer and resuspended in 250 µl BD Stain buffer and subjected to FACS analysis on a FACStar Plus. Mouse anti-human CXCR5 antibody (R&D; mAb190) is used as a positive control. Titration curves were generated for humanized antibodies and Mean Fluorescence Intensity (MFI) plotted against concentration.

[00335] The humanized antibodies of Example 7 were tested for binding to human PMBCs.

[00336] The antibodies, aside from negative control CA13, bind and have the same titration profile on human B cells. Negative control CA13, demonstrated only background binding. BD clone RF8B2 binds poorly to human PBMCs.

EXAMPLE 10: CYNOMOLGUS B CELL REACTIVITY ASSAY

[00337] Cynomolgus (cyno) monkey whole blood was obtained from Bioreclamation, Inc. (Hicksville, NY). The blood was shipped in BD Cell Preparation Tubes (CPT) post-centrifugation. The cyno PBMCs contained in the plasma layer were removed from the CPT tube into a 50 ml tube leaving the gradient gel layer undisturbed. The tube was washed with 5 ml PBS to completely extract all the cells and the wash was added to a fresh 50 ml tube. The cyno PBMCs were centrifuged at 1200 RPM for 10 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 1 ml BD FACS Stain buffer (BD). One million cells were used per assay. One µg of mouse anti-human CXCR5 monoclonal antibody (purified) was added to 50 µl PBMC and allowed to bind for 20 minutes at 4°C. Cells were washed 2 times with BD Stain buffer. Fifty µl of second antibody, goat anti-mouse IgG-PE $F_{(ab')}$ (Beckman Coulter) diluted 1/100, was added to the cells and allowed to bind for 20 minutes at 4°C. Cells were washed three times with BD Stain buffer. A cocktail containing mouse anti-human CD20-FITC (BD) and CD4-APC (BD) at 1/20 dilution each was added to cells for a 20 minute incubation at 4° C for assessment of B/T cell specificity. Cells were washed 3 times with BD Stain buffer, and resuspended in 250 µl BD Stain buffer and subjected to FACS analysis on a FACStarPlus. Commercial mouse anti-human CXCR5 mAb (R&D; MAB190) was used as a positive control.

[00338] Mouse monoclonal 11D6 of the instant invention reactive to human CXCR5, was compared to an IgG isotype control. The humanized versions of 16D7 and the commercially available MAB190 were tested for reactivity to cynomolgus CXCR5. 79B7 also was tested.

[00339] Cells positive for CD20 and CXCR5 were found with MAB190 and 11D6. On the other hand, 16D7 and the humanized variants thereof, as well as G7 and BD RF8B2 and Abnova 2C1 did not bind to cynomolgus B cells. 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 and 79B7 also bound cynomolgus B cells.

[00340] The instant CXCR5 antibodies were used to study peripheral blood cells. B cells expressed CXCR5 and in at least one experiment, about 10% of peripheral T cells were found to express CXCR5.

EXAMPLE 11: SEQUENCING OF ANTI-CXCR5 mABS

[00341] The mouse monoclonal antibodies were isotyped using a commercially available isotyping kit. The variable sequences of 16D7 and other anti-CXCR5 mAb were sequenced. Total RNA was isolated from about 5 million cells of the hybridoma using the Qiagen Qianeasy miniprep kit by following the kit protocol. First strand cDNA was synthesized using the Invitrogen Superscript kit (Cat 11904-018), the kit protocols were followed.

[00342] The heavy chain and light chain variable regions were first amplified using the following degenerate PCR primers and Taq polymerase (Roche) based on methods described in Wang et al. J Immunol Methods. 233:167-77, 2000.

[00343] Heavy chain: Left primer:

1: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEQ ID NO:2)

2: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEQ ID NO:3)

[00344] Heavy chain : Right primer:

GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEQ ID NO:4)

[00345] Light chain: Left primer:

GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID NO:5)

[00346] Light chain: Right primer:

TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEQ ID NO:6)

[00347] where R is either A or G; N is either A, G, T or C; M is either A or C; W is either A or T; S is G or C; and Y is C or T.

[00348] The PCR products were cloned into the pCR4-TOPO® using the Invitrogen TOPO TA cloning® kit (Cat #: 45-0641) and sequenced using T3 and T7 primers. Sequences then were blasted against the gene bank database to deduce

the leader sequences for cloning of full variable regions. Based on the blast results, the following primers (Chardes et al., FEBS Letters 452:386-394, 1999) were chosen for a second round of PCR amplification using Pfx polymerase (Invitrogen).

[00349] Heavy chain:

[00350] Left primer:

CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO:7)

[00351] Right primer:

CGACAAGTCGACTAGCCCTTGACCAGGCATCC (SEQ ID NO:8)

[00352] Light chain:

[00353] Left primer:

WTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO:9)

[00354] Right primer:

CGACTAGTCGACTGGTGGGAAGATGGATACAG (SEQ ID NO:10)

[00355] The PCR products were cloned into pCR-Blunt II®-TOPO® using the Invitrogen Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit (Cat 45-0245) and sequenced using T7 primers.

[00356] Once the light and heavy chains are sequenced, the nucleic acids can be recoded to optimize expression in, for example, human host cells.

EXAMPLE 12: TRANSFECTOMAS

[00357] NS0-eu cells are grown to a density of 1 x 10^6 cells/ml. The cells are maintained in exponential growth phase and medium is changed the day before transfection. The day of transfection, 40 x 10^6 cells are washed. Then, 10 µg of linearized nucleic acid, such as light chain DNA, and 10 µg of, for example, linearized heavy chain DNA are added to the cell suspension (the total DNA volume should be less than 50 µl) and the culture incubated on ice for 15 min. The DNA and cell mixture is transferred to a chilled cuvette (0.4 cm) and an electric pulse (750 V and 25 µF) is applied. The cuvette is placed on ice immediately after the electric pulse and kept on ice for 10-15 min. The cells are collected and plated. The cells are

incubated in a 5% CO_2 incubator for 12-16 days or until colonies appear. The supernatant of the cell colonies or cells grown in suspension culture is tested by ELISA and positive transfectomas are cloned in fresh medium. To further screen the positive transfectomas, either titration ELISA or the Biacore assay is conducted. Expanded transfectomas are maintained in shaker flasks and antibody or derivative thereof collected from the supernatant.

EXAMPLE 13: *IN VIVO* ASSAYS

[00358] Collagen-induced arthritis (CIA), a well-established model for human RA, has been used to demonstrate the efficacy of antibodies to TNFα (Williams et al., PNAS 1992, 89:9784-9788), as well as, fusion proteins of CTLA-4 and TNFα (Webb et al., Eur J Immunol. 1996, 26:2320-2328; and Wooley et al., J Immunol. 1993, 151:6602-6607). A rat anti-mouse CXCR5 monoclonal antibody, clone 1038, was profiled in a mouse model of CIA in which DBA/1J mice were immunized and boosted with chick collagen type II. Disease severity (which was visually scored by measuring paw swelling/inflammation) was monitored twice weekly, while joints collected at study termination were evaluated for changes in inflammation, pannus, cartilage destruction and bone erosion. Clone 1038, when administered in a prophylactic dosing regimen, significantly reduced both disease severity and joint pathology compared to isotype-treated CIA mice (repeated measure ANOVA, $p<0.05$).

[00359] An acute mouse model for assessing efficacy of 16D7-HC1-LC3 in *in vivo* chemotaxis was employed. Briefly, C57/B16 mice (8-16 weeks of age) selectively expressing huCXCR5 on immunocytes, such as B cells, T cells and neutrophils, were generated by traditional transgenic methods using a CD11a promoter. The *in vivo* chemotaxis model is a neutrophil-driven model. On intraperitoneal administration of 20 μg of huCXCL13 ligand (R&D), mouse neutrophils expressing the huCXCR5 receptor migrated to the peritoneal cavity in response to a huCXCL13 gradient. Peritoneal cavity washes were used to recover cells 80 minutes post-intraperitoneal administration of huCXCL13 and

fluorocytometric analysis was used to quantify the number of huCXCR5-expressing neutrophils in 2 ml samples of peritoneal lavages that specifically migrated into the peritoneal cavity in response to huCXCL13 instillation. Neutrophils were identified by phenotypic markers, such as Ly6G, CD19 and CD11b. Subcutaneous administration of humanized anti-hCXCR5, 16D7-HC1LC3, at two different doses (7.5 μg or 15 μg) 24 hours prior to instillation of huCXCL13 showed efficacy in reducing huCXCR5-expressing neutrophil migration to the peritoneal cavity in response to huCXCL13 when compared to an isotype-treated control, the two CXCR5 antibody treated samples demonstrating essentially no statistically different levels of neutrophils as compared to the isotype negative control level of neutrophils. At 1.5 μg, the humanized CXCR5 antibody showed a low level of neutrophil migration inhibition as compared to the higher doses of CXCR5 antibody tested.

EXAMPLE 14: RESURFACING

[00360] Resurfacing of the murine 16D7 clone followed the steps described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:969 and in US Pat. No. 5,639,641.

[00361] The V_L and V_H sequences of 16D7 were blasted against the Protein Data Bank (Nucleic Acids Research, 28:235-242 (2000) or one can access the Protein Data Bank (PDB) on the internet, which contains the 3D coordinates of biological macromolecules, and the ten light and heavy chain amino acid sequences most similar to that of 16D7 were retrieved. The PDB identification codes are used for identifying the sequences.

[00362] The ten closest homologues for the variable light chain were 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), 1AE6 (Proteins 29:161-171, 1997), 1QYG (Pozharski et al., "Carving a Binding Site: Structural Study of an Anti-Cocaine Antibody" in "Complex with Three Cocaine Analogs"), 1UZG (J Virol 79:1223, 2005), 1UB5 (Beuscher et al., "Structure and Dynamics of Blue Fluorescent Antibody 19G2 at Blue and Violet Fluorescent Temperatures"), 1RUR (Proc Natl Acad Sci USA 110:2247-2252, 2004, 1FPT (Nat Struct Biol 2:232-243, 1995), 1QFU (Nat Struct Biol 6:530-534, 1999), 1NAK (Virology 315:159-173 , 2003) and 1CGS (J

Mol Biol 236:247-274, 1994) (redundant sequences were removed) and the ten closest homologues for the variable heavy chain are 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000), 1OAK (Nat Struct Biol 5:189-194, 1998), 1VFB (Proc Natl Acad Sci 91:1089-1093, 1994), 1CIC Nature 348:254-257, 1990), 1GIG (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50:768-777, 1994), 1T4K (J Mol Biol 343:1269-1280, 2004), 1A7P (Marks et al.), 1FE8 (J Biol Chem 276:9985-9991, 2001), 1DL7 (J Exp Med 191:2101-2112, 2000) and 1YY8 (Cancer Cell 7:301-311, 2005). The closest homologs for the light and heavy chain were 1MJU and 1FNS, respectively. Those two sequences were used to build a homology model of the variable domains which was subsequently energy-minimized by a conjugate gradient minimization of atomic coordinate positions with the CHARMM22 force field (J Comput Chem (1983) 4, 187; J Comput Chem (1986) 7, 591) as implemented in the MOE suite (Chemical Computing Group, Quebec, CA). The model was used to locate the CDR regions and the framework residues. The solvent accessibility for each variable region residue of the ten closest homologs for each antibody variable region was calculated and averaged in an Excel spreadsheet as implemented in a Scitegic protocol (Hill & Lewicki (2006) Statistics: Methods and Applications, Statsoft, Tulsa, OK). Positions with greater than a 30% average accessibility were considered surface residues. Positions with average accessibilities of between 25% and 30% were further considered depending on proximity to the CDR loops.

[00363] The surface positions of the murine 16D7 variable region were compared to the corresponding positions in the human antibody sequences. Only those residues which displayed an accessible surface area greater than 30%, with a few residues displaying an accessible surface area greater than 25% and which were flanking solvent exposed residues, were retained for the search. Some conserved residues in all immunoglobulin sequences were included to improve convergence of the search. Only germ line sequences were retained for analysis of the hits. The human antibody variable region surface with the most identical surface residues, with special consideration given to positions that come within 5.0 Å of a CDR, was chosen to replace the murine 16D7 antibody variable region surface residues.

[00364] None of the sequences contains any known B-cell or T-cell epitope listed in the Immune Epitope database (IEDB, Immune Epitope Database and Analysis Resource web site; PLoS Biol. 2005;3(3):e91).

[00365] The original sequences of murine 16D7 variable domains are:

[00366] the light chain (CDRs are underlined):

[00367] DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLLHSSGKTYLY WFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:11); and

[00368] the heavy chain (CDRs are underlined)

[00369] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFL KMNSLQTDDTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:12).

[00370] The retained set of surface residues for the search of the light chain included D1, V3, A7, P9, P15, R16, E17, S18, P45, G46, Q47, D65, R79, R82, E86, K108, E110 and K112.

[00371] The query for the light chain contains the set of surface residues defined above and the conserved amino acids, C23, W40, Q43, Y91, C93, F103, G104, G106 and T107, which were included for the convergence of the BLAST protocol. All the other amino acids could be any of the 20 naturally amino acids. The BLAST search was done against the human germline antibody sequence database compiled by the IMGT (International Immunogenetics Information Systems website, Molec Immunol, 2004, 40:647-659). The best scoring match was found to be X72482 (protein_id=CAA51150.1) from which was derived the light chain, LC4. LC5 and LC6 are two variants of VL4 (VL means variable light) that are suggested to address potential problematic residues in the light chain: 1 exposed methionine (M51) to be mutated to Leu (LC5 & LC6) and 1 potential deamidation site (LC6) where the asparagine N53 is changed to a serine residue. In total, 3 versions are proposed for the variable light chain which contain between 4 and 6 mutations when compared to the parent murine 16D7 clone. The corresponding mutations are given in the following Table 1. Sequential and Kabat numbering are given.

[00372] The retained set of surface residues for the variable heavy chain included Q1, Q3, K5, S7, P9, L11, S15, Q16, S20, P41, G42, K43, S61, A62, K64, S65, R70, S74, Q75, Q86, T87, D88, Q103, L106, A111, A112 and K113 (sequential numbering). The invariant amino acids which were included in the BLAST query for the convergence of the search were: C22, W36, I37, Q39, D89, Y93, C95, W101, G102, G104 and T105. The BLAST search was done against the human germline antibody sequence database compiled by IMGT. One version for the heavy chain (HC3) was retained. The two V_H domains of AF062266 (protein_id=AAC18304.1) and AY393082 (protein_id=AAS86018.1), that showed the best matching score for the set of surface residues, exhibit equivalent similarity score and display identical surface residues. Consequently only a single sequence for the heavy chain was retained with ten mutations. The lower scoring sequences that have different surface residues were not retained as they have less polar residues suggestive of potential reduced solubility.

TABLE 1

Light Chain (sequential numbering)	Light Chain (Kabat numbering)	Version5 (LC4)	Version6 (LC5)	Version7 (LC6)
Ala7	Ala 7	Ser	Ser	Ser
Pro9	Pro 9	Leu	Leu	Leu
Arg16	Arg 16	Gly	Gly	Gly
Met56	Met 51	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn 53	Asn	Asn	Ser
Arg82	Arg 77	Lys	Lys	Lys

In total for VL		4 mutations	5 mutations	6 mutations
Heavy Chain (sequential numbering)	Heavy Chain (Kabat numbering)	(HC3)	(HC3)	(HC3)
Lys5	Lys5	Gln	Gln	Gln
Gln16	Gln16	Glu	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys
Gln86	Gln83	Thr	Thr	Thr
Thr87	Thr84	Ala	Ala	Ala
Asp88	Asp85	Ala	Ala	Ala
Ala111	Ala113	Ser	Ser	Ser
In total for VH		10 mutations	10 mutations	10 mutations

[00373] Three versions are proposed for the light chain (LC4, LC5 and LC6). Individual mutations introduced through the resurfacing of the variable chains are noted in lowercase and underlined and CDRs are underlined. Resurfaced sequences of the variable regions are listed below, the constant domain (IgG4) is not included.

LC4:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLASGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:13)

LC5:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRlSNLASGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:14)

LC6:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLLHSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRISsnLASGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYPYTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:15)

[00374] One version was proposed for the heavy chain (VH3) (VH means variable heavy). Mutations introduced through the resurfacing of the variable chain are in lowercase and underlined, and the CDRs are underlined. The constant domain sequence is not included.

HC3:

QVQLgESGPG LVAPSeSLSI TCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYN psLKSRLSIs KDNSkSQVFL KMNSLtaaDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVS s (SEQ ID NO:16)

[00375] Nucleotide sequences were generated by OE-PCR and cloned into NheI/HindIII sites of the episomal expression vector pXL4214 (Durocher et al., NAR, 2002, 30(2), E9. Sequences are codon optimized for expression in human cells. V_L was fused to IGKC (AAH93097). V_H was fused to IGHG4 (AAH25985), lacking the C-terminal Lys (IGHG4ΔK). Sequences were validated by double strand sequencing.

LC4:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLL HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC GTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC

CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:18)

LC5:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC
GTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:20)

LC6:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGC
GTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:22)

HC3:

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVAPSESLSITCTVSGFSLID
YGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKMN
SLTAADTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:23)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGG
CCTGGTGGCCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT
TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAG
GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA
CCCCAGCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCTCCAAGGACAACAGCAAGAGCC
AGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGACCGCCGCCGACACCGCCATGTAC
TACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAG
CAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCG
GTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTT
CCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGT
GCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTC
CGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAA
CGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCA
AGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGAC
CTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCC

GGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCT
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAA
GACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTG
TGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGT
AAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
GGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCC
AGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGC
TTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGA
GAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACG
TCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA
AGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:24)

EXAMPLE 15: HUMANIZATION

[00376] The V_L and V_H sequences of 16D7 were blasted and the closest homologues for the variable light chain are 1MH5, 1MJJ and 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), with equivalent similarity scores. 1MJU was retained as a template because of high accuracy of the crystal structure, which had been determined down to 1.22Å resolution. The closest homologue for the heavy chain was found to be 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000). The structures, 1MJU and 1FNS, were used to build up a homology model of the variable domains which was subsequently energy minimized using standard procedures. A molecular dynamic (MD) calculation of a 3D homology model of 16D7 was subsequently performed for 1.7 nanoseconds in Generalized Born implicit solvent (see Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499).

[00377] The MD starts by an initialization of the velocities from a Gaussian distribution at 298.15° K, followed by an equilibration period of 300 ps. During the MD, all bonds are constrained using the SHAKE algorithm (see Barth. Et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), the time step was 1 femtosecond (fs), and the simulation, based on the Verlet integration algorithm, was run in the canonical NVT (number of particles, volume and temperature) ensemble at a temperature of 298.15°K. During the production period, 1,700 snapshots were then stored, one every 1 ps. The 1,700 conformations of the murine antibody constitute the ensemble on which the following analysis was performed to identify the most flexible residues.

The Scientific Vector Language (SVL), available within the MOE molecular modeling environment, (Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada) was used to code the following analysis. First, each snapshot, N, was optimally superposed onto its predecessor, the snapshot N-1, to control the overall rotational and translational motions which occur during the MD modeling and calculation. The superposition was obtained by minimizing the Root Mean Square Distance (RMSD) between all pairs of corresponding atoms from the two snapshots. Only the heavy atoms of the antibody backbone were considered in the superposition exercise. Using the same superposition method, each snapshot then was superposed onto the medoïd snapshot. The medoïd snapshot is the antibody conformation with the Cartesian coordinates the closest from the average coordinates of all conformations.

[00378] For each of the antibody residue i, the RMSD between the heavy atoms of the conformation j and a medoïd reference conformation k were calculated. The RMSD has the following formula: $RMSDj=\sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{m}(d_{lk})^2}{m}}$, with d_{lk} defined as the Euclidean distance expressed in Angstroms (Å) between the heavy atom l of the residue j and its counterpart of the medoïd reference conformation k. For the pairwise association of heavy atoms l, the symmetry of the side-chain heavy atoms for the amino acids, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe and Tyr, also was considered. The reference conformation k varies from one residue to another, and corresponds to the medoïd conformation k with the closest Euclidean distance to the average coordinates of all conformations of the studied residue i. Then, for each residue i, a distribution of 1,700 RMSD values, which reflects the variation of coordinates of the residue i in the course of the MD, was obtained. By aggregating all the RMSD values of all the residues of the studied antibody, a global distribution of all RMSDs was obtained. The global distribution of all RMSD then was used as a reference distribution. If the residue i is highly flexible, then a statistical test was performed to decide whether the observed mean RMSD of residue i, m_i, was

significantly higher than the global mean RMSD for all residues, m_g. As the sample is large, e.g. 1,700 for the analysis of clone 16D7, a one-tailed Z-test (see Dorofeev & Grant, "Statistics for real-life sample surveys. Non-simple-random samples and weighted data" 2006. Cambridge University Press) with the null-hypothesis H_0 being that "the observed m_i is lower than the global m_g" was used to calculate the statistic, Z_i according to the formula: $Zi=\frac{(m_i-m_{global})}{\sqrt{\frac{sd_i}{n}}}$, where m_i is the mean RMSD calculated from the RMSD distribution of residue i, m_g is the mean RMSD calculated from the global RMSD distribution, sd_i is the standard deviation calculated from the RMSD distribution of residue i and n is the sample size, i.e. n=1,700 for the analysis of the 16D7 clone. The calculated Zi was then compared to the cumulative probabilities of the standard normal distribution to assess a 99.9% level of significance of the alternative hypothesis, i.e., that "the observed m_i is higher than the global m_g". That corresponded to a Zi ≥ 3.08. The Zi statistic, which can be viewed as a flexibility score, is not correlated with either the molecular weight or the number of heavy atoms of the antibody residue (r^2=0.014 and 0.0009, respectively when analyzing the 16D7 anti-CXCR5 model MD).

[00379] The set of flexible residues for the light chain include the following residues (sequential numbering): D1, T14, P15, R16, E17, Q47, D65, S72 R79, R82, E86, K108, E110 and K112; and for the heavy chain include the following residues: Q1, V2, Q3, L11, S15, Q16, S61, A62, K64, S65, R70, D72, Q75, K81, M82, N83, Q86, Q103, S110, A111, A112 and K113. The flexible portions of 16D7 were compared to the corresponding positions of human antibody sequences in the September 2005 version of the ImMunoGeneTics Database website.

[00380] Those residues which display a significantly high flexible score and a few flanking residues that preserve the 3D structures of the flexible residues were retained for the search.

[00381] The human antibody variable region with the most identical flexible residues, with special considerations given to positions that come within 5.0 Å of a CDR, was chosen to replace the murine the 16D7 antibody variable region

flexible residues. The resulting humanized sequences were blasted for sequence similarity in the UniProtKB/SwissProt database providing confidence that reasonable assumptions had been made. All sequences showed a high degree of similarity to a number of human antibodies. In addition, none of the sequences contains any known B-cell or T-cell epitope listed in the IEDB database.

[00382] The best sequence match in the IEDB for the light chain (LC1, LC2 and LC3) was KPGQPPRLLIYDASNRATGIPA (SEQ ID NO:25), which covers CDR2 but has significant residue difference as typified by a 56% sequence identity obtained from a BLAST search within the IEDB database.

[00383] The best match in the IEDB for the heavy chain (HC1 and HC2) was TDDTAMYYCARI (SEQ ID NO:26) which is located before the start of the CDR3. The sequence exhibits 61% sequence identity with the peptide SEDSALYYCARD (SEQ ID NO:27), making it unlikely to be a potential human T cell epitope (J Exp Med (1995) 181, 1540)

[00384] Original sequences of murine 16D7 variable domains are:

[00385] light chain (CDRs underlined):

[00386] DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLLHSSGKTYLY WFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPYTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:28); and

[00387] heavy chain (CDRs underlined):

[00388] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKMNSLQTDDTA MYYCARIVYWGQGTLVTVS A (SEQ ID NO:29).

[00389] Two versions for the heavy chain (HC1 & HC2) and three versions were suggested for the light chain (LC1, LC2 and LC3). Both versions of the heavy chain are derived from AF262096/AAF79987 and AB063657/BAC01285.1, respectively. The two sequences exhibit equivalent similarity score, but were kept because the sets of residues to mutate appear relatively different and display different physico-chemical properties. The LC1 sequence is derived from BAC01682/AB064054.1 and there are only two residues to be mutated.

LC2 and LC3 are variants of LC1 that are suggested to address potential problematic residues in the light chain: an exposed methionine (M51) mutated to Leu (versions 3 and 4) and one potential deamidation site (version 4) where the asparagine, N53, is changed to a serine residue. Not all combinations were retained but four cover most of the key points to be addressed. Kabat numbering is used.

Table 2

Light Chain (Sequential numbering)	Light Chain (Kabat numbering)	Version1 (LC1)	Version 2 (LC1)	Version3 (LC2)	Version 4 (LC3)
Arg16	Arg16	Gly	Gly	Gly	Gly
Glu17	Glu17	Ala	Ala	Ala	Ala
Met56	Met51	Met	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn53	Asn	Asn	Asn	Ser
	In total for VL	2 mutations	2 mutations	3 mutations	4 mutations
Heavy Chain	Heavy Chain	(HC1)	(HC2)	(HC1)	(HC1)
Gln1	Gln1	Gln	Glu	Gln	Gln
Ser15	Ser15	Ser	Gly	Ser	Ser
Gln16	Gln16	Glu	Gly	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Ala	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Pro	Ser	Ser
Ser65	Ser65	Ser	Gly	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys	Lys
Lys81	Lys81	Lys	Gln	Lys	Lys
Met82	Met82	Val	Met	Val	Val
Asn83	Asn82A	Thr	Asn	Thr	Thr

Gln86	Gln83	Thr	Leu	Thr	Thr
Ala111	Ala113	Ala	Ser	Ala	Ala
	In total for VH	8 mutations	11 mutations	8 mutations	8 mutations

[00390] Mutations introduced through the humanization of the variable chains are in lowercase and underlined and CDRs are underlined. The constant domains are not included.

LC1:

DIVMTQAAPSVAVTPgaSVSISCRSSKSLLHSSGKTYLYW FLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPYTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:30)

LC2:

DIVMTQAAPSVAVTPgaSVS ISCRSSKSLLHSSGKTYLYW FLQRPGQSPQLLIYRISNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)

LC3:

DIVMTQAAPSVAVTPgaSVSISCRSSKSLLHSSGKTYLYW FLQRPGQSPQLLIYRISsLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)

HC1:

QVQLKESGPGLVAPSeSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNpsLKSRLSIsKDNSkSQVFLKvtSLtTDDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:33)

HC2:

eVQLKESGPGLVAPggSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP
PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNapLKgRLSIsKDNSkSQVFLgMNSLkTDDT
AMYYCARIVYWGQGTLVTVSs (SEQ ID NO:34)

[00391] The sequences of the chimeric constructs are as follows:

Chimeric LC Sequence

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRV
EAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGC
GTGGCCGTGACCCCCCGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:36)

Chimeric HC Sequence

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLID
YGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKM
NSLQTDDTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:37)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGG
CCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT
TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAG
GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA
CAGCGCCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCCGCAAGGACAACAGCCAGAGC
CAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATGTA
CTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCC
GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC
TTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC
GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT
AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT
CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCG
GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC
CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGT
CTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTA
GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
GGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC
TGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC
AACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:38)

Humanized VL Sequences

LC1:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRV
EAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:39)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGC
GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA

GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:40)

LC2:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGC
GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:42)

LC3:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLL
HSSGKTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGC
GTGGCCGTGACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAA
GAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGC
GCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCC
AGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCAC
CCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTT
CTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGT
CCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC
TACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC
AAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:44)

Humanized VH Sequences

HC1:

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSESLSITCTVSGFSLID
YGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKVT
SLTTDDTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:45)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGG
CCTGGTGGCCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT
TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAG
GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA
CCCCAGCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGC
CAGGTGTTCCTGAAGGTGACCAGCCTGACCACCGACGACACCGCCATGTA
CTACTGCGCCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCC
GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC
TTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC

GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT
AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT
CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCG
GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC
CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGT
CTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTA
GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
GGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC
TGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC
AACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:46)

HC2:

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLKESGPGLVAPGGSLSITCTVSGFSLI
DYGVNWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNAPLKGRLSISKDNSKSQVFLQ
MNSLKTDDTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID
NO:47)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCA
CCGCCACCGGCGTGCACAGCGAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGG
CCTGGTGGCCCCCGGCGGCAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCT
TCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAG
GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAA
CGCCCCCCCTGAAGGGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGC
CAGGTGTTCCTGCAGATGAACAGCCTGAAGACCGACGACACCGCCATGTA
CTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCC
GGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC
TTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC
GTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC
TCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGT

AACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGT
CCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCG
GACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGAC
CCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGT
CTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTA
GCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
GGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCC
TGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGC
AACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEQ ID NO:48)

EXAMPLE 16: HUMANIZATION BASED ON MOLECULAR DYNAMIC TRAJECTORIES

[00392] The V_L and V_H sequences of 16D7 were blasted in the protein data base (PDB) (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28 :235-242) and the closest homologues for the variable light chain are 1MH5, 1MJJ and 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), with equivalent similarity scores. 1MJU was retained as a template because of high accuracy of the crystal structure, which had been determined up to 1.22 Å resolution. The closest homologue for the heavy chain was found to be 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000). The structures, 1MJU and 1FNS, were used to build up a homology model of the variable domains which was subsequently energy minimized using standard procedures.

[00393] A molecular dynamic (MD) simulation of the 3D homology model of 16D7 was subsequently performed for 1.1 nanosecond (ns) in Generalized Born implicit solvent (see Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499). The MD simulation starts by an initialization of the velocities from a Gaussian distribution at 500 K, followed by an equilibration period of 200 picoseconds (ps). During the MD simulation, all bonds are constrained using the SHAKE algorithm (see Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), the time step was 1 femtosecond (fs), and the simulation, based on the Verlet integration algorithm, was run in the

canonical NVT (number of particles, volume and temperature) ensemble at a temperature of 500 K. This simulation is done with harmonic constraints applied to the backbone atoms. Ten diverse conformations are extracted, one every 100 ps, during the last 1 ns of this first simulation.

[00394] These 10 diverse conformations are then used as 10 diverse starting points to run 10 molecular dynamic simulations, without constraints on the backbone, at a 300 K temperature for 2.3 ns in Generalized Born implicit solvent. Each MD simulation starts by an initialization of the velocities from a Gaussian distribution at 298.15 K, followed by an equilibration period of 300 ps. All bonds are constrained using the SHAKE algorithm (see Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), the time step was 1 fs, and the simulation, based on the Verlet integration algorithm, was run in the canonical NVT (number of particles, volume and temperature) ensemble at a temperature of 298.15 K. During the production period, 2,000 snapshots were then stored, one every 1 ps. The Scientific Vector Language (SVL), available within the MOE molecular modeling environment, (Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada) was used to code the following post-treatment protocol.

[00395] First, each snapshot, N, was optimally superposed onto its predecessor, the snapshot N-1, to discard the overall rotational and translational motions which occur during the MD modeling and calculation. The superposition was obtained by minimizing the Root Mean Square Distance (RMSD) between all pairs of corresponding atoms from the two snapshots. Only the heavy atoms of the antibody backbone were considered in the superposition operation. Using the same superposition method, each snapshot then was superposed onto the medoïd snapshot. The medoïd snapshot is the antibody conformation with the Cartesian coordinates the closest from the average coordinates of all conformations. For each of the 10 MD simulations, the last 2,000 conformations are used to quantify, for each amino acid of the murine antibody, the deviation of the atomic positions with respect to a medoïd conformation of the amino-acid. For each of the antibody residue i, the RMSD between the heavy atoms of the conformation j and a medoïd reference conformation

k were calculated. The RMSD has the following formula: $RMSDj=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{m}(d_{ik})^2}{m}}$, with d_{ik} defined as the Euclidean distance expressed in Angstroms (Å) between the heavy atom I of the residue j and its counterpart of the medoïd reference conformation k. For the pair wise association of heavy atoms I, the symmetry of the side chain heavy atoms for the amino acids, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe and Tyr, also was considered. The reference conformation k varies from one residue to another, and corresponds to the medoïd conformation k with the closest Euclidean distance to the average coordinates of all conformations of the studied residue i.

[00396] The humanizing mutations are found by determining which human antibody germ line is the most similar to the murine antibody in terms of their most flexible amino acids. To do so, the motions of the 60 most flexible amino acids of the murine antibody, during the 20 ns (10 x 2 ns) of molecular dynamic simulation, are compared to the motions of the corresponding amino acids of 49 homology models of human antibody germ lines, for each of which 10 molecular dynamic simulations have been run using the same protocol. The 49 3D homology models of human antibody germ lines were built by systematically combining the 7 most frequent human light chain (vκ1, vκ2, vκ3, vκ4, vλ1, vλ2, vλ3) and the 7 most frequent heavy chains (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

[00397] The 60 most flexible amino acids exclude any amino acid in the CDR, and its immediate vicinity, i.e. amino acid with an α carbon at a distance of less than 5 Å to any α carbon of CDR amino acids as seen in the 3D homology model.

[00398] The flexibility is quantified by comparing the RMSD (Fi) of a given amino acid (i) to its medoïd conformation as defined previously, averaged over 10 molecular dynamic simulations, to the RMSD (Fm) of all amino acids of the murine antibody, averaged over the same 10 molecular dynamic simulations. An amino acid is considered flexible enough to potentially interact with the T-cell

receptors, and trigger an immune-response, if the flexibility score Zi, defined as Zi = (Fi – Fm)/Fm, is above 0.15.

[00399] Using this molecular dynamic averaged flexibility estimation protocol, 23 amino acids have been considered as flexible in the variable region of the murine 16D7 antibody, excluding the CDR region and its immediate vicinity thereof.

[00400] The set of flexible residues for the light chain include the following residues (sequential numbering): R16, E17, R44, G46, Q47, S48, R79, R82, E84, E86, and E110; and for the heavy chain include the following residues: K5, P41, G42, K43, K64, R70, D72, N73, S74, Q75, Q86, and Q103.

[00401] The quadridimensional similarity of the murine antibody to the 49 human germ line homology models is quantified by sampling the positions of specific atoms of the 60 flexible amino acids, using all picosecond snapshots of the 10 molecular dynamic simulations, by means of a unique tridimensional cubic grid. This grid has a 1 Å resolution. The tridimensional grid is made of 445740 points and has been initialized using the tridimensional structure of a human antibody crystallographic model based on antibody, 8FAB (Biochem 30:3739-3748, 1991). The 8FAB model is also used to position all picosecond snapshot conformations of an antibody which are sampled in the tridimensional grid. For this purpose, the medoïd conformation of the molecular dynamic of the antibody is superposed onto the 8FAB model. This superposition consists of aligning the moments of inertia of the 2 models, followed by the minimization of the scalar distances between the α carbons of both models. All the remaining conformations of the molecular dynamic simulation are superposed onto the medoïd conformation using the same method.

[00402] Two types of sampling are done which result in two similarities (electrostatic similarity and lipophilic similarity), for a pair of antibodies being compared. These two similarities are then added to obtain the total similarity. The electrostatic sampling considers all atoms of the amino acid side chain. The value in one point, x, of the grid is obtained by applying a tridimensional Gaussian function f(x) weighted with the atomic partial charge as described in the Amber99 force field (Cieplak et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22 :1048-1057). The f(x) function is applied on

the 3 Cartesian coordinate axis using the following formula: $f(x) = \left(s\sqrt{2\pi}\right)^{-3} \times \exp\left(\frac{-(x-u)^2}{2s^2}\right)$, x and u being, respectively, the Cartesian coordinates of a grid point and a sampled amino-acid atom, and s = r/1.6 (r = covalence radius of the atom). The sampling is repeated for all conformations of the amino acid and the obtained results are averaged at all points of the tridimensional grid. The lipophilic sampling considers only the lipophilic atoms of the amino acid side-chain. The value at one point of the grid is calculated with the same Gaussian function f(x) without weighting. As a result, the two ensembles of picosecond snapshot conformations from the molecular dynamic simulations, of the two antibodies being compared are sampled by the same tridimensional grid. The electrostatic similarity (sim-elec), between antibody a and antibody b, can be calculated with the following formula: $sim-elec = \frac{\sum_{i=1}^{445240}\left(\left|x_i^a + x_i^b\right| - \left|x_i^a - x_i^b\right|\right)}{\sum_{i=1}^{445240}\left(\left|x_i^a + x_i^b\right|\right)}$. The lipophilic similarity is calculated with the same formula applied to the data generated by the lipophilic sampling previously described.

[00403] The human germ line model vλ2-vh4 displays the highest quadridimensional similarity (total similarity = 50%) of its 60 most flexible amino acids with respect to the 60 most flexible amino acids of the murine antibody 16D7. The human germ line model vλ2-vh4 has thus been used to replace the murine antibody 16D7 flexible residues. Beforehand, the amino acids of the two sequences were aligned according to the optimal superposition of the α carbons of the corresponding 3D homology models. Unwanted motifs were searched for in the resulting humanized sequences using a blast search, as previously described in paragraph 41 above. In addition, known B-cell or T-cell epitopes were searched for in the resulting humanized sequences using the IEDB database as described in paragraph 44, supra.

[00404] The best sequence match in the IEDB for the light chain (LC7) was PGKAPQLLIYRMSNL (SEQ ID NO:52), which covers CDR2. The sequence

exhibits 73% sequence identity with the peptide PGKAPKLLIYAASSL (SEQ ID NO:53) which shows binding to HLA-DRB1 0404* but has not been demonstrated to be immunogenic in man (J Immunol (1995) 155, 5655).

[00405] The best match in the IEDB for the heavy chain (HC4 and HC5) was SLIDYGVNWIRQPPG (SEQ ID NO:54) which covers CDR1 but has significant residue difference as typified by a 40% sequence identity obtained from a BLAST search within the IEDB database.

[00406] Two versions for the heavy chain (HC4 & HC5) and one version for the light chain (LC7) were obtained. Both versions of the heavy chain are derived from the human germ line model vλ2-vh4. HC5 is a variant of HC4 with an additional mutation to address a potential problematic residue: one potential deamidation site where the asparagine, N60, is changed into a proline residue.

[00407] Mutations introduced through the humanization of the variable chains are in lowercase and underlined and CDR's are underlined. The constant domains are not included.

LC7:

DIVMTQAAPSVAVTPgqSVSISCRSSKSLLHSSGKTYLYWFLQhPGkaPQ LLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLtISgVqAEDVGVYYCMQHLEYP YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:55)

HC4:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLtTDDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:56)

HC5:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYpSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLtTDDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:57)

Light Chain (Sequential numbering)	(LC7)	
ARG16	GLY	
GLU17	GLN	
ARG44	HIS	
GLN47	LYS	
SER48	ALA	
ARG79	THR	
ARG82	GLY	
GLU84	GLN	
In total for VL	8 mutations	
Heavy Cham	(HC4)	(HC5)
LYS5	GLN	GLN
ASN60	ASN	PRO
ARG70	SER	SER
ASN73	THR	THR
GLN75	LYS	LYS
GLN86	THR	THR
In total for VH	5 mutations	6 mutations

EXAMPLE 17: PHARMACOKINETICS

[00408] The study is conducted with a suitable number of animals, (for example, 4 in a study; 2 for single dose and 2 for repeat dose, 5 doses weekly) healthy, purpose-bred male Cynomolgus monkeys weighing between 2.0 and 5.4 kg and ranging from 2 to 7 years of age. The animals can be allocated to two treatment groups, one receiving control IgG4 antibodies and one group receiving humanized 16D7. Monkeys in each group are administered a single intravenous bolus dose for example, 2.5-10 mg/kg in a dose volume of 2-3 mL/kg, or 5 weekly doses, i.v. Blood samples are collected at various time points after each dose administration and processed to plasma. The plasma samples are analyzed for concentration of total IgG4 and CXCR5 mAbs using an ELISA.

EXAMPLE 18: COMPARATIVE STUDIES

[00409] Some of the instant antibodies were compared to commercially available antibodies in side-by-side experiments. MAB190, available from R & D Systems, is a mouse mAb. RF82B is a rat anti-human CXCR5 available from BD. Clone 2C1 is a mouse mAb with a GST tag available from Abnova. The various humanized antibodies described herein were isotyped using reagents and methods known in the art. For example, those taught herein have a κ light chain, many are IgG1, while 46C9, 68D3 and H28 IgG2a. Most of the antibodies bind to the amino terminal end of CXCR5, and several of the antibodies compete with each other for binding to the same epitope or region..

[00410] The BD antibody binds poorly to human PBMCs.

[00411] While the antibodies generally did not bind to cynomolgus cells, 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 and 79B7 of the instant invention did.

[00412] 16D7 was found to be of higher affinity, at least 10-fold, than the commercial antibodies, and has an off rate 100 times better than the other antibodies.

EXAMPLE 19: SCALE-UP

[00413] Each monoclonal antibody variant was produced in suspension-cultivated HEK293 FS™ cells by transient transfection of two expression plasmids encoding the heavy or the light chain complexed with 293fectin™ (Invitrogen). Secreted proteins were harvested eight days post-transfection and centrifuged. Proteins were purified by affinity chromatography on Protein A (ProSepvA, Millipore) after elution from the column with 25 mM citrate pH 3, 0.15 M NaCl buffer. The monoclonal antibodies were formulated in PBS and 0.22 μm filtered. Protein concentration was determined by measurement of absorbance at 280 nm. Each batch was analyzed by SDS-PAGE (Nupage Bistris/ MES-SDS 10%) under reducing and non-reducing conditions to determine the purity and the molecular weight of each subunit and of the monomer. Each protein lot was also analyzed by

gel filtration (Tricorn 10/300 GL Superdex 200) to determine the homogeneity of the monomer and the presence of high molecular weight species.

[00414] From 240 mL cultures, a total of 30 to 40 mg of eight 16D7 variant monoclonal antibodies was available and of appropriate quality for subsequent *in vitro* and *in vivo* tests.

[00415] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

What is Claimed:

1. An isolated human or a humanized polypeptide that specifically binds to the extracellular domain of human CXCR5.

2. The polypeptide of claim 1, comprising an antibody.

3. The polypeptide of claim 2, further comprising a constant region.

4. The polypeptide of claim 3, comprising a C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} or combinations thereof.

5. The polypeptide of claim 3, wherein the constant region is from an IgG antibody.

6. The polypeptide of claim 5, wherein the IgG antibody is an IgG4 antibody.

7. A nucleic acid encoding the polypeptide of claim 1.

8. A vector comprising the nucleic acid of claim 7.

9. A cell comprising the vector of claim 8.

10. An antibody or antibody fragment comprising the polypeptide of claim 1.

11. The antibody or antibody fragment of claim 10, further comprising a variable light chain.

12. The antibody or antibody fragment of claim 10, further comprising a variable region of a heavy chain.

13. The polypeptide of claim 1, wherein polypeptide comprises a single chain Fv.

14. A method of treating a patient having a disorder comprising CXCR5 positive cells, comprising administering to said patient a CXCR5 antagonist, which binds CXCR5.

15. The method of claim 14, wherein said antagonist comprises the polypeptide of claim1.

16. The method of claim 14, wherein said CXCR5 positive cell is a B cell.

17. The method of claim 14, wherein said disorder is arthritis.

18. The method of claim 14, wherein said CXCR5 positive cell is activated by CXCL13.

19. The method of claim 14, wherein said CXCR5 positive cell is a T cell.

20. A method of making the polypeptide of claim 1, comprising:

(a) identifying a human variable region homologous to a variable region of a non-human CXCR5 antibody;

(b) identifying from molecular conformations of a variable region of said non-human CXCR5 antibody, amino acids which are flexible and amino acids that flank said flexible residue and retain the molecular conformation of said variable region;

(c) identifying amino acids homologous to said identified amino acids of step (b) in said human variable region;

(d) replacing said identified amino acids of step (b) with said identified amino acids of step (c) to produce a humanized variable region; and

(e) joining said humanized variable region of step (d) with a human sequence to yield a humanized polypeptide that specifically binds CXCR5.

21. The method of claim 20, wherein said step (b) comprises molecular dynamic modeling.

22. The method of claim 20, wherein step (d) comprises not replacing amino acids more than 5 Å from a complementarity determining region.

23. The method of claim 20, further confirming said humanized variable region of step (d) resembles a human antibody by comparing said humanized variable region sequence with the sequences of a collection of human antibody sequences.

24. The method of claim 20, further confirming said humanized variable region of step (d) resembles a human antibody by comparing said humanized variable region trajectory with the sequences of a collection of human antibody trajectories.

25. The method of claim 20, wherein the humanized variable region of step (d) does not comprise a B cell epitope or a T cell epitope.

TÍTULO

"ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS, DERIVADOS DE LOS MISMOS Y SU USO"

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-CXCR5 y con su uso en la mejora, tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos en mamíferos, que incluyen seres humanos, que resultan de la actividad o metabolismo impropia del CXCR5, o con el uso inapropiado o accidental del mismo, por ejemplo, por un patógeno. Un anticuerpo de interés puede bloquear el acoplamiento de un ligando, tal como CXCL13, con su receptor, tal como CXCR5. También se describen composiciones profilácticas, inmunoterapéuticas y de diagnóstico que comprenden los anticuerpos y derivados de los mismos de interés y su uso en métodos para prevenir o tratar enfermedades en mamíferos, que incluyen que incluyen seres humanos, producidas por un metabolismo y/o actividad inapropiado de células $CXCR5^+$, tales como linfocitos B. Tales enfermedades incluyen deficiencias autoinmunes y enfermedades producidas o caracterizadas por inflamación, tales como artritis reumatoide (RA), donde el CXCR5 está regulado por aumento.

ANTECEDENTES

[0002] El CXCR5, también conocido como el receptor del linfoma de Burkitt (BLR1), CD185, MDR15 y MGC117347, es un receptor acoplado a proteínas G que es un miembro de la familia de receptores de quimiocinas CXC. Un ligando es BLC, también conocido como CXCL13, que es un quimioatrayente de células B.

[0003] El precursor de CXCR5 no procesado tiene una longitud de 372 aminoácidos con un peso molecular de 42 K_D.

[0004] El CXCR5 tiene una función en la migración y localización de las células B dentro de compartimentos anatómicos particulares. Los ratones con genes inactivados carecen de ganglios linfáticos periféricos, tienen menos placas de Peyer y tienen menores niveles de células B que los ratones normales.

RESUMEN

[0005] La presente invención proporciona nuevos anticuerpos humanizados y humanos y fragmentos y derivados de los mismos, que se unen específicamente al CXCR5. Algunos de los anticuerpos y fragmentos de unión al CXCR5 de los mismos se pueden alterar para evitar la formación de enlaces disulfuro intracatenarios dando como resultado

una molécula que es estable a lo largo de la preparación y uso *in vivo*. Otros anticuerpos de interés pueden alterarse para minimizar la unión al F_cR. Algunos anticuerpos CXCR5 de interés compiten con CXCL13 por la unión al CXCR5. Otros anticuerpos reducen la actividad de CXCR5.

[0006] La invención incluye las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de los anticuerpos y sus correspondientes secuencias de ácido nucleico.

[0007] Otra realización de la invención incluye las secuencias de las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de los anticuerpos para obtener moléculas de unión que comprenden una o más regiones CDR, o regiones derivadas de CDR, que retienen la capacidad de unión al CXCR5 de la molécula progenitora a partir de la cual se obtiene la CDR.

[0008] Un anticuerpo de interés puede ser uno que impide la unión de CXCL13, u otro ligando, a células $CXCR5^+$, tales como células B.

[0009] Otra realización de la presente invención incluye las estirpes celulares y vectores que contienen las secuencias de anticuerpo de la presente invención.

[0010] Otra realización de la presente invención es el uso de los anticuerpos para la preparación de un medicamento o composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la función y el metabolismo del CXCR5.

[0011] Otra realización de la presente invención es el uso de estos anticuerpos en el tratamiento de trastornos asociados con una biología y función atípica o anómala del CXCR5.

[0012] Se describen otras características y ventajas adicionales, y serán evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0013] Esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, estirpes celulares, vectores o reactivos descritos aquí, porque pueden variar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Además, la terminología usada aquí tiene el objetivo de ejemplificar únicamente realizaciones particulares y no debe limitar el alcance de la presente invención. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo utilizado aquí utilizado aquí tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto en la técnica en el campo de la invención. En la práctica de la presente invención se puede utilizarse utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos aquí y sólo se describen métodos, dispositivos y materiales de ejemplo.

[0014] Todas las patentes y publicaciones mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad con el fin de describir y analizar las proteínas, enzimas, vectores, células anfitrionas y metodologías presentadas aquí que podrían utilizarse con y en la presente invención. Sin embargo, nada aquí debe considerarse una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha descripción por virtud de la invención anterior.

[0015] Antes de la enseñanza de los métodos de elaboración y uso de los productos de interés relacionados con CXCR5, se proporcionan las siguientes definiciones no limitantes de algunos términos y frases para guiar al experto.

[0016] El "CXCR5" se relaciona con la molécula conocida de ocurrencia natural que se encuentra en los linfocitos, particularmente células B y particularmente células B que no han sido tratadas; con dicha molécula aislada a partir de dichas células; con dicha molécula fabricada de manera recombinante utilizando materiales y medios conocidos, y con el uso de un ácido nucleico que codifica un CXCR5; así como con partes del CXCR5, tales como el dominio extracelular (EC), que conserva las características y propiedades relevantes para la práctica de la presente invención, tales como la unión a CXCL13. Una molécula de CXCR5 soluble puede consistir esencialmente en el dominio EC de CXCR5 que incluye, en general, aproximadamente los primeros sesenta aminoácidos de la molécula, es decir, la parte amino terminal de CXCR5.

[0017] El CXCR5 es un receptor no promiscuo. El CXCL13 es un ligando de CXCR5 y se expresa constitutivamente en células estromáticas tales como células dendríticas foliculares y en tejidos linfoides. El CXCL13 atrae específicamente a las células B y a un pequeño subconjunto de células T denominadas células T foliculares auxiliares de B, TFH. Que no puede ser inesperado dada la mayoría de la interacciones entre las poblaciones de células B y células T en el sistema inmunológico. Más aún, las células T activadas inducen o regulan en por aumento la expresión del CXCR5. Se ha descubierto que la infiltración de linfocitos en centros germinales (GC) ectópicos terciarios se correlaciona bien con una mayor gravedad de la enfermedad y pérdida de tolerancia en ciertos trastornos que se preajustan con tales estructuras parecidas a ganglios linfáticos atípicos. utilizando modelos de murinos *in vivo*, tales como ratones CXCR5-/- y CXCL13-/-, la ausencia del receptor o el ligando produce una arquitectura fina de GC alterada debido a una localización alterada de células T y B, y posiblemente interacción. Estos ratones también están protegidos frente al desarrollo de una artritis inducida por colágeno (CIA) severa. Como el CXCR5 se expresa selectivamente en células B maduras, que están asociadas con la patogenia de RA, el bloqueo de este receptor modulará la respuesta artritogénica en individuos afectados. El tratamiento de la artritis reumatoide con agentes biológicos (es decir, anticuerpos anti-TNFα

y anti-CD20, Rituximab) ha resultado ser clínicamente eficaz; en particular, pacientes sometidos a una terapia dirigida a las células B han demostrado mejorías de larga duración en síntomas y signos clínicos. La fijación selectiva del CXCR5 como objetivo, que sólo se expresa en células B maduras y en células T auxiliares de B, no afectará al desarrollo de las células B ni inmunocomprometerá al paciente. A diferencia de Rituximab, el anticuerpo de la presente memoria es un anticuerpo neutralizador que no media la citotoxicidad celular.

[0018] Una "enfermedad del CXCR5" es un malestar, trastorno, enfermedad, afección, anomalía y similares, que se caracteriza o se produce por una sobreexpresión o un mayor nivel de CXCL13 u otro ligando del CXCR5, un mayor nivel de células B, mayores niveles de actividad de células B, mayores niveles del CXCR5 o un metabolismo y actividad inapropiada del CXCR5.

[0019] Por "actividad de células B" se entiende niveles de células B mayores de lo normal, que pueden ser locales, o indicios de una manifestación biológica o función de una célula B, tal como la expresión de anticuerpos, presencia o actividad tirosina cinasa de Bruton, expresión o presencia de CD19, expresión o presencia de factor de activación de células B y similares.

[0020] La frase "sustancialmente idéntico" con respecto a una secuencia polipeptídica de una cadena de anticuerpo puede considerarse una cadena de anticuerpo que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o más con la secuencia polipeptídica de referencia. La expresión con respecto a una secuencia de ácido nucleico puede considerarse una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 97% o más con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

[0021] Las expresiones "identidad" u "homología" pueden significar el porcentaje de bases de nucleótidos o residuos de aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos al residuo de una secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias y de introducir espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad para la secuencia completa, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. No debe considerarse que ninguna inserción ni extensión N-terminal o C-terminal reduce la identidad o la homología. Se dispone de métodos y programas informáticos para el alineamiento y son bien conocidos en la técnica. La identidad de secuencias puede medirse utilizando un software de análisis de secuencias.

[0022] Las frases y términos "fragmento funcional, variante, derivado o análogo" y similares, así como formas de las mismas, de un anticuerpo o antígeno se refieren a un

compuesto o molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa o antígeno de interés. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-CXCR5 es uno que puede unirse a una molécula de CXCR5 o uno que puede impedir o reducir sustancialmente la capacidad de un ligando, tal como CXCL13, o de un anticuerpo agonista o antagonista, de unirse al CXCR5. Un ejemplo es una molécula de scF_V. En cuanto a una variante del CXCR5 o derivado del mismo, es una molécula que no es idéntica a un CXCR5 natural pero que puede utilizarse para un fin de la presente invención aunque no sea idéntica al CXCR5 de tipo silvestre, no obstante, se puede utilizar como un inmunógeno para inducir anticuerpos que se unen selectivamente al CXCR5 de tipo silvestre.

[0023] Son variantes de "sustitución" aquellas en las que por lo menos un residuo aminoacídico de una secuencia natural se ha retirado y se ha reemplazado por un aminoácido diferente insertado en su sitio en la misma posición. Las sustituciones pueden ser individuales, cuando sólo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, cuando se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las sustituciones plurales pueden estar en sitios consecutivos. Además, un aminoácido puede reemplazarse por múltiples residuos, en cuyo caso dicha variante comprende tanto una sustitución como una inserción. Son variantes de "inserción" aquellas en las que se han insertado uno o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en una secuencia natural. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado al grupo funcional α-carboxilo o α-amino del aminoácido. Son variantes de "eliminación" aquellas en las que se han eliminado uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos natural. Normalmente, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

[0024] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo o polipéptidos sintéticos que llevan una o más secuencias CDR o derivadas de CDR siempre que los polipéptidos presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Generalmente, los anticuerpos se consideran Ig con una especificidad definida o reconocida. De esta manera, aunque los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas parecidas a anticuerpos que carecen de especificidad por una diana. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG,

IgE, IgM, IgD, IgA y así sucesivamente), o subclase (por ejemplo IgG_1, IgG_2, IgG_{2a}, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2 y así sucesivamente) ("tipo" y "clase", y "subtipo" y "subclase", se usan indistintamente aquí). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas naturales o de tipo silvestre, es decir, obtenidas a partir de un miembro de una población no manipulado artificialmente, normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo. Por "no manipulado artificialmente" se entiende no tratado para que contenga o exprese una molécula de unión a antígenos externos. Tipo silvestre se refiere a la especie o alelo más prevalente encontrado en una población o al anticuerpo obtenido a partir de un animal no manipulado, en comparación con un alelo o polimorfismo, o una variante o derivado obtenido por una forma de manipulación, tal como mutagenia, uso de métodos recombinantes y similares, para cambiar un aminoácido de la molécula de unión a antígenos.

[0025] Como se usa aquí, "anticuerpo anti-CXCR5" se refiere a un anticuerpo o polipéptido derivado del mismo (un derivado) que se une específicamente al CXCR5 humano como se define aquí, incluye, pero no se limita a, moléculas que inhiben o reducen sustancialmente la unión de CXCR5 a sus ligandos o inhibe la actividad del CXCR5.

[0026] El término "variable", en el contexto de un dominio variable de anticuerpos, se refiere a ciertas partes de la molécula pertinente que difieren considerablemente en la secuencia entre y con los anticuerpos y se usan en el reconocimiento y unión específica de un anticuerpo particular para su diana particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. La variabilidad se concentra en tres segmentos denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) también conocidas como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan secuencias o regiones de estructura (FR). Los dominios variables de cada cadena pesada y ligera natural comprende cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectada por tres CDR, que forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas a menudo próximas por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana (epítopo o determinante) de anticuerpos (véase Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National

Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Como se utiliza aquí, la numeración de los residuos aminoacídicos de una inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos aminoacídicos de inmunoglobulinas de Kabat et al., a menos que se indique otra cosa. Una CDR puede tener la capacidad de unirse específicamente al epítopo afín.

[0027] La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de una cadena intacta o de longitud completa o a un anticuerpo, generalmente la región variable o de unión al objetivo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ y F_v. Un "fragmento funcional" o "análogo de un anticuerpo anti-CXCR5" es uno que puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor de unirse a un ligando o de iniciar la señalización. Como se utiliza aquí, fragmento funcional generalmente es sinónimo de "fragmento de anticuerpo" y con respecto a los anticuerpos, puede hacer referencia a fragmentos tales como F_v, F_{ab}, $F_{(ab')2}$ y así sucesivamente en los que puede impedir o reducir sustancialmente la capacidad del receptor de unirse a un ligando o de iniciar la señalización. Un fragmento "F_v" consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente (dímero V_H-V_L). En esa configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero V_H-V_L, como en un anticuerpo intacto. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana en el anticuerpo intacto. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un F_v que comprende sólo tres CDR específicas por una diana) puede tener la capacidad de reconocer y de unirse a la diana.

[0028] Los fragmentos de anticuerpo "F_v monocatenario" "sF_v" o "scAb" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de F_v además comprende un ligador polipeptídico, a menudo una molécula flexible, entre los dominios V_H y V_L, que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión a la diana.

[0029] El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígenos, cuyos fragmentos pueden comprender un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Por medio del uso de un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios variables de la misma cadena, los dominios del diacuerpo se ven forzados a emparejarse con los dominios de unión de otra cadena para crear dos sitios de unión a antígenos.

[0030] El fragmento F_{ab} contiene los dominios variables y constantes de la cadena

ligera y el dominio variable y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos $F_{ab'}$ difieren de los fragmentos F_{ab} por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxilo del dominio C_{H1} para incluir una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Los fragmentos $F_{ab'}$ pueden producirse por división del enlace disulfuro en las cisteínas de bisagra del producto de digestión con pepsina de $F_{(ab')2}$. Otros tratamientos enzimáticos y químicos adicionales de anticuerpos pueden producir otros fragmentos funcionales de interés.

[0031] La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos con la excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores.

[0032] Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular (tipo o subtipo), siendo el resto de la cadena o cadenas idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada de unión al CXCR5 o de afectar a la actividad o al metabolismo del CXCR5 (Patente de Estados Unidos nº 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). De esta manera, las CDR de una clase de anticuerpo pueden injertarse en la FR de un anticuerpo de una clase o subclase diferente.

[0033] Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un solo sitio objetivo, epítopo o determinante. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos) de un antígeno, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales se sintetizan ventajosamente por una célula anfitriona, sin contaminar por otras inmunoglobulinas, lo cual permite la clonación del gen relevante y el ARNm que codifica el anticuerpo o sus cadenas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso con la presente invención se pueden aislar a partir de colecciones de anticuerpos en fagos utilizando técnicas

bien conocidas o pueden purificarse a partir de una preparación policlonal. Los anticuerpos monoclonales progenitores a usar de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse por el método de hibridoma descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden obtenerse por métodos recombinantes bien conocidos en la técnica.

[0034] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como F_v, F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ u otras subsecuencias de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de plantilla de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (F_c), típicamente la de la plantilla de inmunoglobulina humana elegida. En general, el objetivo es disponer de una molécula de anticuerpo que sea mínimamente inmunogénica en un ser humano. De esta manera, es posible que uno o más aminoácidos de una o más CDR también puedan cambiarse por uno que sea menos inmunogénico para un anfitrión humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de dichas una o más CDR al CXCR5 o a CXCL13. Como alternativa, la FR puede ser no humana, pero los aminoácidos más inmunogénicos se reemplazan por otros menos inmunogénicos. Sin embargo, el injerto de CDR, como se ha descrito anteriormente, no es la única manera de obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, es posible que no sea suficiente la modificación únicamente de las regiones CDR ya que es bastante común que los residuos de estructura tengan una función en la determinación de la estructura tridimensional de los bucles de CDR y la afinidad global del anticuerpo por su ligando. Por lo tanto, puede ponerse en práctica cualquier medio de manera que la molécula de anticuerpo progenitor no humano se modifique para que sea una menos inmunogénica para un ser humano, y no siempre es necesaria la identidad global de la secuencia con un anticuerpo humano. De esta manera, la humanización también puede conseguirse, por ejemplo, por la sola sustitución de unos pocos residuos, particularmente los que están expuestos en la molécula de anticuerpo y no ocultos dentro de la molécula y por lo tanto, no fácilmente accesibles para el sistema inmune del anfitrión. Dicho método se enseña aquí con respecto a la sustitución de residuos "móviles" o "flexibles" en la molécula de anticuerpo, siendo el objetivo reducir o mitigar la inmunogenicidad de la molécula resultante sin comprometer la especificidad del anticuerpo por su epítopo o determinante. Ver, por ejemplo, Studnicka et al., Prot Eng 7(6)805-814,

1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), documento WO 2006/042333 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.869.619.

[0035] La respuesta inmune adaptativa tiene dos brazos principales: la respuesta inmune celular de los linfocitos T y la respuesta inmune humoral de linfocitos B secretores de anticuerpos. Los epítopos de células B pueden ser aminoácidos contiguos, lineales, o pueden ser conformacionales (Protein Science (2005) 14, 246). Por el contrario, los epítopos de células T son péptidos lineales cortos que se dividen de proteínas antigénicas que se presentan en el contexto de proteínas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC), o, en el caso de seres humanos, moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I o de clase II. La presentación de epítopo depende tanto de la unión al péptido MHC como de las interacciones con el receptor de las células T (TCR). Las proteínas del MHC son altamente polimórficas y cada una se une a una serie limitada de péptidos. De esta manera, la combinación particular de alelos del MHC presentes en un anfitrión limita el intervalo de posibles epítopos reconocidos durante una infección.

[0036] Dos tipos fundamentales de células T se distinguen por la expresión de proteínas CD8 y CD4, que dictan si una célula T reconocerá epítopos presentados por moléculas de clase I o de clase II, respectivamente. Los epítopos T $CD4^+$ se procesan después de la encapsulación por células que presentan antígeno en vesículas unidas a la membrana, donde el antígeno se degrada por proteasas para dar fragmentos peptídicos que se unen a proteínas del MHC de clase II. Por el contrario, las células T $CD8^+$ generalmente reconocen antígenos virales o autoantígenos expresados desde el interior de una célula, proteínas que se dividen en péptidos cortos en el citosol por el inmunoproteasoma. Después de la división, los péptidos se translocan por el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) al interior del retículo endoplásmico para cargarse en antígenos HLA I. Los epítopos de células T $CD4^+$ (auxiliares) son críticos para dirigir respuestas inmunes dependientes de células T frente a antígenos proteicos.

[0037] Un método de humanización de interés se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmune. La flexibilidad de una proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de una proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o un solo residuo aminoacídico para adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. La información sobre la flexibilidad de la proteína puede obtenerse realizando experimentos de cristalografía de rayos X (ver, por ejemplo, Kundu et

al. 2002, Biophys J 83:723–732.), experimentos de resonancia magnética nuclear (ver, por ejemplo, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) o realizando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación MD de una proteína se realiza en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína durante un periodo calculando las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el periodo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de proteínas, denominadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el periodo de la simulación, por ejemplo, cada 1 picosegundo (ps). Por medio del análisis del conjunto de instantáneas se puede cuantificar la flexibilidad de los residuos aminoacídicos de la proteína. De esta manera, un residuo flexible es uno que adopta un conjunto de diferentes conformaciones en el contexto del polipéptido dentro del cual reside dicho residuo. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, Nueva York, 1988). Varios programas de software permiten simulaciones de MD, tales como Amber (véase Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (véase Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; y MacKerell et al. (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

[0038] La mayoría de complejos de proteína comparten una superficie oculta relativamente grande y plana y se ha demostrado que la flexibilidad de los compañeros de unión proporciona el origen de su plasticidad, lo cual permite que se adapten conformacionalmente entre sí (Structure (2000) 8, R137-R142). Como tales, se ha demostrado que ciertos ejemplos de "ajuste inducido" tienen una función dominante en las interfaces de contacto proteína-proteína. Además, cada vez hay más datos que demuestran que las proteínas realmente se unen a ligandos de diversas, formas, tamaños y composición (Protein Science (2002) 11:184-187) y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad de reconocer diferentes patrones (Science (2003) 299, 1362-1367). Los residuos flexibles están implicados en la unión de patrones de proteína-proteína (Structure (2006) 14, 683-693).

[0039] Los residuos flexibles pueden adoptar una diversidad de conformaciones que proporcionan un conjunto de áreas de interacción que probablemente se reconocerán por las células B de memoria y desencadenarán una respuesta inmunogénica. De esta manera, un anticuerpo puede humanizarse modificando varios residuos de la región de estructura de manera que el conjunto de conformaciones y de áreas de reconocimiento presentadas por el

anticuerpo modificado se parezcan lo máximo posible a las adoptadas por un anticuerpo humano.

[0040] Esto puede conseguirse al modificar un número limitado de residuos al: (1) construir un modelo de homología del mAb progenitor y realizar una simulación MD; (2) analizar los residuos flexibles e identificar los residuos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humana, así como identificar residuos o motivos que probablemente serán fuente de heterogeneidad o de una reacción de degradación; (3) identificar un anticuerpo humano que presente el conjunto de áreas de reconocimiento más similar al del anticuerpo progenitor; (4) determinan los residuos flexibles a mutar, donde también se mutan residuos o motivos con probabilidad de ser una fuente de heterogeneidad y degradación; y (5) comprobar la presencia de epítopos de células T o B conocidos. Los residuos flexibles pueden encontrarse utilizando un cálculo MD como se enseña en este documento utilizando un modelo de disolvente implícito, que explica la interacción del disolvente acuoso con los átomos de la proteína durante el periodo de la simulación.

[0041] Una vez que se ha identificado la serie de residuos flexibles dentro de las cadenas variables ligera y pesada, se identifica una serie de estructuras de región variable de cadena pesada y ligera humana que se parecen mucho a las del anticuerpo de interés. Esto puede hacerse, por ejemplo, utilizando una búsqueda blast en la serie de residuos flexibles frente a una base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana. Esto también puede hacerse comparando la dinámica del mAb progenitor con la dinámica de una colección de estructuras canónicas germinales. Los residuos CDR y los residuos vecinos se excluyen de la búsqueda para asegurar que se conserva una alta afinidad por el antígeno.

[0042] Así, se conduce una comparación de la trayectoria dinámica molecular del anticuerpo de interés con las trayectorias de una colección de estructuras de anticuerpo de línea germinal. Se compara el 16D7 con una colección de estructuras de anticuerpo de línea germinal. La trayectoria dinámica molecular retenida de cada anticuerpo es un conjunto de cálculos dinámicos moleculares durante la simulación de computador dinámica molecular en donde, se utilizan, por ejemplo, aproximadamente 10 conformaciones diversas como diversos puntos de partida, y para cada punto de partida se corren aproximadamente 10 simulaciones dinámicas moleculares. Se construyen 49 modelos de homología 3D de líneas germinales de anticuerpo humano al combinar sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes (vκ1, vκ2, vκ3, vκ4, vλ1, vlλ2, vλ3) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5 y vh6) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593~D597). Los residuos flexibles de 16D7 se cambian luego a los residuos correspondientes de la estructura de línea germinal con una trayectoria más cercana a aquella

del anticuerpo de interés.

[0043] Después se reemplazan los residuos flexibles. Cuando varios residuos humanos muestran homologías similares, la selección se dirige también por la naturaleza de los residuos que probablemente afectan al comportamiento de la solución del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, en los bucles flexibles expuestos se preferirán residuos polares a los residuos hidrófobos. Los residuos que son una fuente potencial de inestabilidad y heterogeneidad también se mutan aunque se encuentren en las CDR. Esto incluirá las metioninas expuestas, ya que se puede formar sulfóxido a partir de radicales de oxígeno, la división proteolítica de enlaces lábiles a ácidos tales como los del dipéptido Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), sitios de desamidación encontrados con un residuo de asparagina expuesto seguido de un aminoácido pequeño tal como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43) y sitios de N-glicosilación tales como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Típicamente, las metioninas expuestas se sustituirán por una Leu, las asparaginas expuestas se reemplazarán por una glutamina o por un aspartato, o se cambiará el siguiente residuo. Para el sitio de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiará el residuo Asn o el residuo Ser/Thr.

[0044] En la secuencia compuesta resultante se comprueba la presencia de epítopos de células T lineales o epítopos de células B conocidos. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con la Base de Datos de Epítopos Inmunológicos (IEDB) disponible públicamente (PLos Biol (2005) 3 (3) e91). Si se encuentra un epítopo conocido dentro de la secuencia compuesta, se recupera y se sustituye otra serie de secuencias humanas

[0045] A diferencia del método de recubrimiento (modificación de superficie) de la Patente de Estados Unidos N° 5.639.641, por medio de este método se tratan tanto las respuestas inmunogénicas mediadas por células B como las mediadas por células T. El método también evita el problema de pérdida de actividad que se observa algunas veces con el injerto de CDR (Patente de Estados Unidos N° 5.530.101). Además, también se consideran cuestiones de estabilidad y de solubilidad en el proceso de ingeniería genética y de selección, dando como resultado un anticuerpo que está optimizado para una baja inmunogenicidad, alta afinidad por el antígeno y mejores propiedades biofísicas.

[0046] Se describen estrategias y métodos para recubrir la superficie de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un anfitrión diferente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.639.641. En resumen, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de posiciones de un grupo de regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo para producir posiciones expuestas en la superficie en zonas de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera, donde las

posiciones de alineamiento para todas las regiones variables tienen una identidad de por lo menos aproximadamente 98%; (2) se define una serie de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie en una zona de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera para un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor (o un fragmento del mismo); (3) se identifica una serie de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de zonas de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera que es la más idéntica a la serie de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie del roedor; y (4) la serie de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie en zonas de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera definido en la etapa (2) se sustituye por la serie de residuos aminoacídicos expuestos en la superficie en zonas de estructura de la región variable de cadena pesada y ligera identificados en la etapa (3), excepto para aquellos residuos aminoacídicos que están dentro de 5Å de cualquier átomo de cualquier residuo de una CDR del anticuerpo de ratón, para producir un anticuerpo humanizado, tal como un anticuerpo de ratón que retiene la especificidad de unión.

[0047] Se pueden humanizar los anticuerpos mediante una variedad de otras técnicas que incluyen el injerto de CDR (EPO 0 239 400; WO 91/09967; y Patentes de Estados Unidos N° 5.530.101 y 5.585.089), revestir o recubrir (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332). Se pueden obtener los anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan, métodos de exhibición de fagos, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y los WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, utilizando animales transgénicos tales como roedores, utilizando células quiméricas y así sucesivamente.

[0048] "Homólogo de anticuerpo" u "homólogo" se refiere a cualquier molécula que se une específicamente al CXCR5 como se enseña aquí. Así, un homólogo de anticuerpo incluye un anticuerpo natural o recombinante, si se modifica o no, partes de anticuerpos que retienen las propiedades biológicas de interés, tales como la unión al CXCR5, tal como una molécula F_{ab} o F_v, un anticuerpo monocatenario, un polipéptido que lleva una o más regiones CDR y asó sucesivamente. No es necesario que la secuencia de aminoácidos del homólogo sea idéntica a la del anticuerpo de ocurrencia natural, sino que se puede alterar o modificar para llevar aminoácidos sustitutos, aminoácidos insertados, aminoácidos eliminados, aminoácidos distintos de los veinte encontrados normalmente en proteínas y así sucesivamente, para obtener un polipéptido con mejoradas propiedades u otras propiedades

benéficas.

[0049] Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo CXCR5 de la presente invención. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de un anticuerpo de la presente invención. "Homología de secuencia", cuando se aplica a una secuencia de aminoácidos aquí, se define como una secuencia con una homología de secuencia de por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o mayor, y más preferiblemente una homología de secuencia de por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con otra secuencia de aminoácidos, como se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988).

[0050] Un anticuerpo quimérico es uno con diferentes porciones de un anticuerpo derivado de diferentes fuentes, tales como diferentes anticuerpos, diferentes clases de anticuerpo, diferentes especies animales, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino emparejados con una región constante de inmunoglobulina humana y así sucesivamente. Así, un anticuerpo humanizado es una especie de anticuerpo quimérico. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos, ver, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

[0051] Los anticuerpos artificiales incluyen anticuerpos monocatenarios, fragmentos scFv, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (ver las revisiones de Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293-299; y Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11:548-557), cada uno con capacidad de unión a antígenos o de unión a epítopos. En el fragmento monocatenario Fv (scFv), los dominios V_H y V_L de un anticuerpo se conectan mediante un péptido flexible. Típicamente, el ligador es un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos. Si el ligador es mucho más pequeño, por ejemplo de 5 aminoácidos, se forman diacuerpos que son dímeros de scFv bivalentes. Si el ligador se reduce a menos de tres residuos aminoacídicos, se forman estructuras triméricas y tetraméricas que se denominan triacuerpos y tetracuerpos, respectivamente. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, única, típicamente la CDR2 o 3de la cadena pesada que tiene suficiente capacidad de reconocimiento y de unión específica. Pero puede ser cualquier combinación de secuencias de CDR como se puede determinar por los que practican los métodos enseñados aquí. Tal un fragmento se denomina una unidad de reconocimiento molecular o mru. Varios de estos mru se pueden unir con péptidos ligadores cortos,

formando por lo tanto una proteína de unión artificial con una mayor avidez que un único mru.

[0052] También incluidos dentro del alcance de la invención están los equivalentes funcionales de un anticuerpo de interés. El término "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, homólogos de anticuerpo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, donde cada equivalente funcional se define por la capacidad de unirse al CXCR5, inhibir la capacidad de señalización o la función de CXCR5, o inhibir la unión de CXCL13 y otros ligandos al CXCR5. El experto en la técnica entenderá que existe una superposición en el grupo de moléculas denominado "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales." Los métodos para producir equivalentes funcionales que retienen la capacidad de unión de CXCR5 son conocidos para la persona experto y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/21319, EPO N° de Ser. 239.400, WO 89/09622, EPO N° de Ser. 338.745 y EPO N° de Ser. 332.424.

[0053] Los equivalentes funcionales de la presente solicitud incluyen también anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos modificados mediante la adhesión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, desamidación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, división proteolítica, ligado a un ligando celular, ligado a una toxina o a un grupo funcional citotóxico u otra proteína, etc. No necesariamente la unión covalente produce un anticuerpo que sea inmune a partir de la generación de una respuesta anti-idiotípica. Las modificaciones pueden conseguirse por técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, división química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0054] Muchas técnicas están disponibles para el experto en las mismas que permiten la optimización de la afinidad de unión. Típicamente, las técnicas involucran la sustitución de diversos residuos aminoacídicos en el sitio de interés, seguido de un análisis de selección de afinidad de unión del polipéptido mutante para el epítopo o antígeno afín.

[0055] Una vez identificado y aislado el anticuerpo, a menudo es útil generar un anticuerpo variante o mutante, o muteína, en el que se han alterado uno o más residuos aminoacídicos, por ejemplo, en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, en el anticuerpo pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de residuos de estructura que producen una mejora

en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo para CXCR5. Los ejemplos de residuos de región de estructura que pueden modificarse incluyen los que no se unen covalentemente al antígeno directamente (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); interaccionan con/afectan a la conformación de una CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); y/o participan en la interfaz de V_L-V_H (EP 239 400). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de estos residuos de la región de estructura produce una intensificación de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno afín. Por ejemplo, en esta realización de la invención pueden alterarse de aproximadamente uno a aproximadamente cinco residuos de estructura. Algunas veces, esto puede ser suficiente para producir un anticuerpo mutante adecuado para uso en ensayos preclínicos, aunque no se haya alterado ninguno de los residuos de la región hipervariable. Sin embargo, normalmente, el mutante de anticuerpo puede comprender una o más alteraciones de la región hipervariable. Las regiones constantes también pueden alterarse para obtener propiedades efectoras deseables o más deseables.

[0056] Los residuos de la región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo progenitor es tal que pueden explorarse fácilmente mutantes de anticuerpo producidos de manera aleatoria para unión alterada en un ensayo como se enseña aquí.

[0057] Un procedimiento para obtener mutantes de anticuerpo, tales como mutantes de CDR, es la "mutagenia por exploración de alanina" (Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989); y Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). Uno o más de los residuos de la región hipervariable se reemplazan por residuos de alanina o polialanina. Este o estos residuos de región hipervariable que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego al introducir mutaciones adicionales u otras, mutaciones en o para los sitios de sustitución. De esta manera, aunque se predetermina para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, no es necesario que esté predeterminada la naturaleza de la mutación per se. Pueden intentarse sustituciones similares con otros aminoácidos, dependiendo de la propiedad deseada de los residuos explorados.

[0058] Un método más sistemático para identificar residuos aminoacídicos a modificar comprende identificar residuos de la región hipervariable implicados en la unión al CXCR5 y los residuos de la región hipervariable con poca o ninguna implicación en la unión al CXCR5. Se realiza una exploración de alanina de los residuos de la región hipervariable que no se unen, con cada mutante de ala probado para intensificar la unión al CXCR5. En otra realización, se seleccionan los residuos implicados significativamente en la unión al CXCR5 para ser modificados. La modificación puede implicar la eliminación de un residuo

o la inserción de uno o más residuos adyacentes a un residuo de interés. Sin embargo, normalmente, la modificación implica la sustitución del residuo por otro aminoácido. Una primera sustitución puede ser una sustitución conservadora. Si esta sustitución produce un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, en la afinidad de unión), entonces puede hacerse otra sustitución conservadora para determinar si se obtienen más cambios sustanciales.

[0059] Pueden realizarse incluso más modificaciones sustanciales en una serie de anticuerpos y la presentación de propiedades biológicas al seleccionar un aminoácido que difiere más sustancialmente en las propiedades del que reside normalmente en un sitio. De esta manera, esta sustitución se puede realizar aunque manteniendo: (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

[0060] Por ejemplo, los aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

[0061] (1) hidrófobos: metionina (M o met), alanina (A o ala), valina (V o val), leucina (L o leu) e isoleucina (I o ile);

[0062] (2) neutros, hidrófilos: cisteína (C o cys), serina (S o ser), treonina (T o thr), asparagina (N o asn) y glutamina (Q o gln);

[0063] (3) ácidos: ácido aspártico (D o asp) y ácido glutámico (E o glu);

[0064] (4) básicos: histidina (H o his), lisina (K o lys) y arginina (R o arg);

[0065] (5) residuos que influencian en la orientación de la cadena: glicina (G o gly) y prolina (P o pro), y

[0066] (6) aromáticos: triptófano (W o trp), tirosina (Y o tyr) y fenilalanina (F o phe).

[0067] Las sustituciones no conservadoras pueden suponer el intercambio de un aminoácido por un aminoácido de otro grupo. Las sustituciones conservadoras pueden implicar el cambio de un aminoácido por otro dentro de un grupo.

[0068] Las sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de estos análogos. Los análogos pueden incluir varias muteínas de una secuencia distinta de la secuencia del péptido de ocurrencia natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia de ocurrencia natural (preferiblemente en la

porción del polipéptido fuera del dominio que forma los contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia progenitoras, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia progenitora) a menos que haya un cambio en el volumen o conformación del grupo R o la cadena lateral, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

[0069] Normalmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad o similitud de secuencia de aminoácido de por lo menos 75% con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-CXCR5 humano progenitor, o una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% y con frecuencia por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a la secuencia de anticuerpo progenitora se define aquí como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, es el mismo resto) o similares (es decir, son residuos aminoacídicos del mismo grupo basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales, *supra*) con los residuos del anticuerpo progenitor, después de alinear las secuencias y de introducir espacios, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia.

[0070] Como alternativa, se pueden generar mutantes de anticuerpos mediante mutación sistemática de las regiones FR y CDR de las cadenas pesada y ligera, o la región F_c del anticuerpo anti-CXCR5. Otro procedimiento para generar mutantes de anticuerpo implica el uso de maduración de afinidad utilizando exhibición de fago (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Se sabe que las fusiones de proteínas de cubierta de bacteriófagos (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); y Patente de Estados Unidos N° 5.223.409) son útiles para ligar el fenotipo de proteínas o péptidos expuestos al genotipo de partículas de bacteriófagos que los codifican. También se han expuesto dominios F_{ab} de anticuerpos en fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991); y Garrard et al. Biotechnol 9:1373 (1991)).

[0071] La exhibición de fagos monovalentes consiste en exposición una serie de

variantes de proteína como fusiones de una proteína de la cubierta de bacteriófagos en partículas de fago (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). La maduración de la afinidad, o mejora de las afinidades en equilibrio de varias proteínas, se ha logrado previamente por medio de la aplicación sucesiva de mutagenia, exhibición de fagos monovalentes y análisis funcional (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); y Patente de Estados Unidos N° 5.534.617), por ejemplo, centrándose en las regiones CDR de anticuerpos (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); y Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).

[0072] Se pueden construir colecciones de muchas (por ejemplo, 10^6 o más) variantes de proteínas, que difieren en posiciones definidas de la secuencia, en partículas de bacteriófagos, cada una de las cuales que contiene un ADN que codifica la variante de proteína particular. Después de los ciclos de purificación por afinidad, utilizando un antígeno inmovilizado, se aíslan clones de bacteriófagos individuales, y se deduce la secuencia de aminoácidos de la proteína expuesta a partir del ADN.

[0073] Después de la producción del mutante de anticuerpo, se puede determinar la actividad biológica de esa molécula con respecto al anticuerpo progenitor como se enseña aquí. Como se ha indicado anteriormente, esto puede implicar la determinación de la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas o propiedades físicas del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se exploran para afinidad de unión para el antígeno. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de la exploración se someten opcionalmente a uno o más ensayos adicionales de actividad biológica para confirmar que el mutante o mutantes de anticuerpo tienen propiedades nuevas o mejoradas. En realizaciones preferidas, el mutante de anticuerpo retiene la capacidad de unirse al CXCR5 con una afinidad de unión similar o mejor/mayor que aquella del anticuerpo progenitor.

[0074] Se puede someter el mutante o mutantes de anticuerpo seleccionados de esta manera a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso deseado del anticuerpo. Estas modificaciones pueden implicar una alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión a polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes. Por ejemplo, se puede sustituir un residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del mutante del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir una reticulación aberrante. Por el contrario, se puede agregar una cisteína al anticuerpo para mejorar la estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento F_v).

[0075] Otro tipo de mutante de anticuerpo tiene un patrón de glicosilación alterado. Esto se puede lograr al eliminar uno o más grupos funcionales de carbohidrato encontrados

en el anticuerpo y/o al agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos típicamente está N-ligada a Asn u O-ligada a Ser o Thr. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento comunes para la adhesión enzimática de un grupo funcional de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o xilosa, por ejemplo, se unen a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original puede mejorar la probabilidad de glicosilación logada a O.

[0076] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función del efector, con el fin de mejorar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden introducirse residuos de cisteína en la región F_c, permitiéndose de esta manera la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esa región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una mejor capacidad de internalización y/o mayor destrucción de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), véase Caron et al., J Exp Med 176:1191-1195 (1992) y Shopes, Immunol 148:2918-2922 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones F_c dobles y por lo tanto puede tener mejores propiedades de lisis por el complemento y ADCC, véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219 230 (1989).

[0077] Dentro del alcance de la invención se incluyen modificaciones covalentes del anticuerpo. Éstas se pueden obtener mediante síntesis química o mediante división enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Se introducen en la molécula otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo al hacer reaccionar residuos aminoacídicos diana del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con el residuo N-terminal o C-terminal.

[0078] Se pueden hacer reaccionar los residuos cisteinilo con α-haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboxilmetilo o carboxiamidometilo. También se pueden derivar los residuos cisteinilomediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α-bromo-β-(5-imidozoil)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercura-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, por ejemplo.

[0079] Se pueden derivar los residuos histidilo mediante reacción con

dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0. También se puede utilizar bromuro de p-bromofenacilo, se realiza la reacción preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6.0.

[0080] Se pueden hacer reaccionar los residuos lisinilo y de terminalα con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos para invertir la carga de los residuos. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen α-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea y 2,4-pentanodiona, y el aminoácido se puede catalizar por transaminasa conglioxilato.

[0081] Se pueden modificar los residuos arginilo mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginina a menudo requiere condiciones de reacción alcalinas. Adicionalmente, los reactivos pueden reaccionar con lisina así como con el grupo ε-amino de arginina.

[0082] Se puede modificar los residuos de tirosilo con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Por ejemplo, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y 3-nitroderivados, respectivamente. Los residuos de tirosilo se pueden yodar utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para uso en un radioinmunoensayo.

[0083] Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse por reacción con carbodiimidas (R-N=C=C-R'), donde R y R' pueden ser diferentes grupos alquilo tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

[0084] Los residuos glutaminilo y asparaginilo a menudo se desamidan para dar los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

[0085] Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serinilo o treonilo, la metilación de los grupos α-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0086] Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos no requieren la producción del anticuerpo en una célula anfitriona que tenga capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N- o glicosilación ligada a O-. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el

azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en la WO 87/05330 y en Aplin & Wriston, CRC Crit Rev Biochem, pág. 259-306 (1981).

[0087] La eliminación de cualquier residuo de carbohidrato presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La desglicosilación química, por ejemplo, puede requerir la exposición del anticuerpo al compuesto, ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente, dando como resultado la división de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar logador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que queda intacto el anticuerpo. La desglicosilación química se describe, por ejemplo, en Hakimuddin et al. Arch Biochem Biophys 259:52 (1987) y en Edge et al., Anal Biochem 118:131 (1981). La división enzimática de residuos de carbohidrato presentes en anticuerpos puede conseguirse por cualquiera de una diversidad de endoglicosidasas y exoglicosidasas como se describe, por ejemplo, en Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350(1987).

[0088] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende lograr el anticuerpo a uno o una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

[0089] Otra técnica preferida para obtener mutantes o muteínas es la maduración de la afinidad por exhibición de fagos (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992); y Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838 (1991)). En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpo generados de esta manera se presentan en forma monovalente sobre partículas de fago como fusiones a una proteína encontrada en las partículas. El fago expresa diversos mutantes que puede someterse a ciclos a través de series de selección de unión, seguido del aislamiento y secuenciación de esos mutantes que presentan alta afinidad.

[0090] El método de selección de nuevos polipéptidos de unión puede utilizar una colección de polipéptidos relacionados estructuralmente. La colección de polipéptidos relacionados estructuralmente, por ejemplo, fusionados a una proteína de la cubierta de un fago, se produce por mutagenia, y se presenta en la superficie de la partícula. Las partículas después se ponen en contacto con una molécula diana y las partículas que tienen la mayor afinidad por la diana se separan de las de menor afinidad. Los aglutinantes de alta afinidad

después se ejemplifican por infección de un anfitrión bacteriano adecuado y se repite la etapa de unión competitiva. El proceso se repite hasta que se obtienen los polipéptidos de la afinidad deseada.

[0091] Como alternativa, también pueden utilizarse fagos multivalentes (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; y Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628) para expresar mutaciones puntuales aleatorias (por ejemplo, generadas por medio del uso de una polimerasa de ADN con tendencia a errores) para generar una colección de fragmentos de anticuerpos en fagos que puede ser detectada para afinidad al CXCR5, Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 254:889-896.

[0092] Preferiblemente, durante el proceso de maduración de afinidad, el vector de expresión replicable está bajo un control estricto de un elemento regulador de transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de manera que la cantidad o número de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión sea menor de aproximadamente 1%. También preferiblemente, la cantidad de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión es menor de 10% de la cantidad de partículas que presentan una sola copia de la proteína de fusión. Preferiblemente, la cantidad es menor de 20%.

[0093] Pueden producirse equivalentes funcionales intercambiando diferentes CDR de diferentes cadenas de anticuerpo dentro de una estructura o una FR compuesta derivada de una pluralidad de anticuerpos.. De esta manera, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para una serie dada de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, por ejemplo, IgG_{1-4}, IgM, IgA_{1-2} o IgD, para producir diferentes tipos e isotipos de anticuerpo para CXCR5. De manera similar, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención se pueden producir que incluyen un conjunto de CDR dado en un marco completamente sintético.

[0094] Por ejemplo, se obtiene una porción F_c y estructura adecuados para llevar la región variable o una o más CDR de interés a partir de una molécula IgG4, que tiene función efectora reducida.

[0095] En otras realizaciones, para intensificar las propiedades de una molécula de unión al CXR5 de interés, se pueden hacer ciertas modificaciones a la parte de estructura y/o parte Fc de la molécula que lleva la porción de unión a antígeno de una molécula de interés. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos para intensificar o reducir las propiedades de interés. Así, en una molécula IgG4, las sustituciones en los sitios conocidos para impactar la función, por ejemplo, en la región de bisagra, en una región que impacta una función efectora o que impacta la unión Fc, por ejemplo, son adecuadas para modificación. En una molécula IgG4, las sustituciones, que utilizan numeración Kabat, en los aminoácidos

225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240,241, 242, 243,244,245, 246, 247,248,249,250, 251, 252,253,254,255 y así sucesivamente, o combinaciones de los mismos, se pueden hacer para obtener las propiedades deseadas. Por ejemplo, sustituir una prolina por una serina 241 puede estabilizar las estructuras terciarias y cuaternarias de la moléculas (Mol Imm 30(1)105-108, .1993), y sustituir el acido glutámico por leucina 248 puede amortiguar las funciones efectoras O hnm 164(4)1925-1033, 2000; y Oin Innn 98(2) 164-174,2001).

[0096] Otras propiedades benéficas son la obtención de un derivado de anticuerpo que se une al CXCR5 pero, por ejemplo, no agota las células B. Debe ser ventajoso que la producción de anticuerpo de un paciente no esté comprometida. El tratamiento con tal un reactivo también facilita un régimen de combinación con un segundo fármaco para una indicación particular que actúa como un nivel diferente al de la célula B. Por ejemplo, que puede estar al nivel de las células B. Por ejemplo, que puede estar al nivel de las células T.l

[0097] Por lo tanto, por ejemplo, se trata el 16D7-HCI-LC3 para contener dos sustituciones, S241P y L248E. Los residuos de ácido glutámico y prolina confieren propiedades deseadas sobre una molécula de unión al CXR5 de interés que lleva una estructura IgG4, tal como, estabilidad y función efectora reducida.

[0098] Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención incluyen las moléculas con un grado detectable de unión específica al CXCR5. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de por lo menos 10-100%, preferiblemente por lo menos 50%, 60% o 70%, más preferiblemente por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la capacidad de unión de un anticuerpo de interés. También se incluyen equivalentes con una afinidad mayor de 100% de la de un anticuerpo de interés.

[0099] Las CDR generalmente son importantes para el reconocimiento de epítopo y unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden realizarse cambios a los residuos que constituyen las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse al epítopo afín. Por ejemplo, pueden realizarse cambios que no afectan al reconocimiento del epítopo, pero aumentan la afinidad de unión del anticuerpo por el epítopo. Varios estudios han inspeccionado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diversas posiciones en la secuencia de un anticuerpo, basándose en el conocimiento de la secuencia primaria del anticuerpo, en sus propiedades, tales como la unión y el nivel de expresión (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; y Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

[00100] De esta manera, pueden generarse equivalentes de un anticuerpo de interés al cambiar las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2

o CDR3, o en regiones de estructura, utilizando métodos tales como mutagenia dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos, mutagenia de casetes, PCR con tendencia a error, mezcla de ADN o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; y Adey et al., 1996, Chap. 16, pág. 277-291, en Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Los métodos para cambiar la secuencia de ácido nucleico del anticuerpo primario pueden resultar en anticuerpos con mejor afinidad (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; y Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

[00101] Pueden utilizarse ciclos repetidos de "selección de polipéptidos" para seleccionar la unión de cada vez más afinidad por medio de, por ejemplo, la selección de múltiples cambios de aminoácidos que se seleccionan por la selección múltiple de ciclos. Después de una primera serie de selección, que implica una primera región de selección de aminoácidos en el polipéptido del ligando o del anticuerpo, se realizan series adicionales de selección en otras regiones o aminoácidos del ligando. Los ciclos de selección se repiten hasta que se consiguen las propiedades de afinidad deseadas.

[00102] Los anticuerpos mejorados incluyen también aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan mediante técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

[00103] "Antagonista" se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas de una molécula diana, tal como señalización por CXCR5. Los antagonistas pueden interferir con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, al incapacitar o matar células activadas por un ligando, y/o por medio de la interferencia con la activación del receptor o el ligando (por ejemplo, activación de tirosina cinasa) o la transducción de señales después de la unión de un ligando a un receptor. El antagonista puede bloquear completamente las interacciones de receptor-ligando o puede reducir sustancialmente estas interacciones. Todos estos puntos de intervención por un antagonista se considerarán equivalentes para los fines de la presente invención. De esta manera, dentro del alcance de la invención se encuentran antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizadores) que se unen al CXCR5, CXCL13 u otros ligandos de CXCR5, o un complejo de CXCR5 y su ligando, tal como CXCL13; variantes de la secuencia de aminoácidos o derivados de CXCR5 o CXCL13 que antagonizan la interacción entre CXCR5 y un ligando, tal como CXCL13; CXCR5 soluble, opcionalmente fusionado a una

molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoadhesina); un complejo que comprende CXCR5 en asociación con otro receptor o molécula biológica; péptidos sintéticos o de secuencia natural que se unen al CXCR5; y similares.

[00104] "Agonista" se refiere a un compuesto, que incluyen una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, una molécula grande o una molécula pequeña, que activa una o más actividades biológicas de CXCR5. Los agonistas pueden interactuar con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, por actuación como un mitógeno de células activado por un ligando, y/o por interferencia con la inactivación de células o la inhibición de la transducción de señales después de la unión de un ligando a un receptor. Todos estos puntos de intervención por un agonista se considerarán equivalentes para los fines de la presente invención. De esta manera, dentro del alcance de la presente invención se incluyen agonistas que se unen al CXCR5, CXCL13 u otro ligando de CXCR5, o un complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13; variantes de la secuencia de aminoácidos o derivados de CXCR5 o CXCL13 que facilitan la interacción entre CXCR5 y un ligando, tal como CXCL13; CXCR5 soluble, opcionalmente fusionado a una molécula heteróloga tal como una región de inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoadhesina); un complejo que comprende CXCR5 en asociación con otro receptor o molécula biológica; péptidos sintéticos o de secuencia natural que se unen al CXCR5; y similares. El agonista generalmente es una entidad que activa directamente CXCR5, por ejemplo, para la señalización.

[00105] Las expresiones "célula," "estirpe celular" y "cultivo celular" incluyen su descendencia. También se entiende que toda la descendencia puede no ser precisamente idéntica, tal como en el contenido de ADN, debido a una mutación deliberada o involuntaria. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o propiedades biológicas de interés para las que se realiza la selección en la célula original. Las "células anfitrionas" utilizadas en la presente invención generalmente son anfitriones procariotas o eucariotas, seleccionados según la elección del diseño.

[00106] La "transformación" de un organismo celular, célula o estirpe celular con un ácido nucleico significa introducir un ácido nucleico en la diana de manera que el ácido nucleico se pueda replicar, como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica, y opcionalmente expresado. La "transfección" de una célula u organismo con un ácido nucleico se refiere a la captación del ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo, se exprese o no alguna secuencia codificante. Las expresiones "célula anfitriona transfectada" y "transformada" se refieren a una célula en

la que se introdujo un ácido nucleico. Las células anfitrionas procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Las células anfitrionas eucariotas típicas son células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, o células de origen humano. La secuencia de ácido nucleico introducida puede proceder de la misma especie que la célula anfitriona o de una especie diferente de la célula anfitriona, o puede ser una secuencia de ácido nucleico híbrida que contiene algunos ácidos nucleicos externo y algunos ácidos nucleicos homólogos. .

[00107] El término "vector" significa una construcción de ácido nucleico, un vehículo, que contiene un ácido nucleico, el transgén, la secuencia externa o el gen de interés, que puede estar unido operativamente a secuencias de control adecuadas para la expresión del transgén en un anfitrión adecuado. Estas secuencias de control incluyen, por ejemplo, un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosomas del ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o sólo un inserto genómico potencial. Una vez transformado el anfitrión adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del anfitrión, o en algunos casos, puede integrarse en el genoma de la célula anfitriona. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente, ya que el plásmido es una forma de vector usada comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores que tienen función de vehículo equivalentes y que son o que están siendo conocidas en la técnica tales como virus, moléculas sintéticas que llevan ácidos nucleicos, liposomas y similares.

[00108] "Mamífero", para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluyen seres humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

[00109] Los anticuerpos de interés se pueden detectar o se ´pueden utilizar utilizarse en un ensayo como el descrito aquí o como se conoce en la técnica. A menudo, estos ensayos requieren que un reactivo sea detectable, por ejemplo, que esté marcado. La palabra "marcador", cuando se utiliza aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que puede conjugarse directa o indirectamente con una molécula o proteína, por ejemplo, un anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos, partículas o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[00110] Como se utiliza aquí, "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la que se puede adherir una entidad o molécula, tal como el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas incluidas aquí incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poros controlados), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pozo de una placa de ensayo; en otras puede utilizarse en una columna de purificación (por ejemplo, en una columna de cromatografía de afinidad). De esta manera, la fase sólida puede ser un papel, una perla, un plástico, un chip y similares, puede estar hecho de una diversidad de materiales tales como nitrocelulosa, agarosa, poliestireno, polipropileno, silicio y similares, y puede estar en una diversidad de configuraciones.

[00111] CXCR5 soluble o sus fragmentos, tales como el dominio extracelular (EC), pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos de interés. El inmunógeno puede obtenerse o aislarse a partir de fuentes naturales o puede obtenerse de manera recombinante. Pueden utilizarse como inmunógenos para obtener los anticuerpos de interés células enteras tales como células $CXCR5^+$, células derivadas de una fuente natural (por ejemplo, células B, estirpes celulares B o estirpes celulares cancerígenas) o células transformadas (o transfectadas) por técnicas recombinantes para expresar, y quizás sobreexpresar CXCR5, como el inmunógeno para elaborar los anticuerpos de interés. También pueden utilizarse preparaciones de membrana que llevan CXCR5 o péptidos sintéticos o polipéptidos truncados que corresponden a las regiones EC de CXCR5, como se conoce en la técnica.

[00112] El EC, que tiene una longitud de aproximadamente 60 aminoácidos, o porciones de los mismos, de CXCR5 puede utilizarse como inmunógeno. Por aquellos expertos en la técnica serán evidentes otras formas del inmunógeno útiles para preparar anticuerpos, tales como un conjugado. Así, CXCR5, o porciones del mismo, pueden unirse a una molécula de vehículo, tal como albúmina o KLH, para utilizarse como un inmunógeno. Por supuesto, con células que expresan CXCR5, este es el dominio EC el que es el inmunógeno preferido o una parte del inmunógeno.

[00113] El gen o un ADNc que codifica CXCR5, como el conocido en la técnica, puede clonarse en un plásmido o en otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de varios sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y mostrados más adelante, por ejemplo. Debido a la degeneración del código genético, una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos o la proteína CXCR5 pueden utilizarse en la práctica de expresar CXCR5

recombinante o productos funcionales del mismo. La secuencia de nucleótidos puede variar al seleccionar combinaciones basadas en posibles elecciones de codones, tales como las preferidas por la célula anfitriona. Las combinaciones se realizan de acuerdo con el código genético de tripletes estándar aplicado a la secuencia de nucleótidos que codifica CXCR5 de ocurrencia natural y pueden considerarse todas estas variaciones. Así, la secuencia codificante de CXCR5 puede registrarse de manera que contenga codones que expresan el aminoácido de interés, sin embargo, el codón de tripletes es uno favorecido por la maquinaria de expresión de genes de la célula anfitriona, tal como una célula humana. Cualquiera de estos polipéptidos puede utilizarse en la inmunización de un animal, tal como un camélido, u otro sistema para generar anticuerpos que se unan al CXCR5.

[00114] Como se ha mencionado anteriormente, cuando sea beneficioso, el inmunógeno CXCR5 puede expresarse como una proteína de fusión que tiene CXCR5 adherido a un segmento de fusión, que generalmente es un polipéptido con una o más funciones benéficas. El segmento de fusión a menudo ayuda en la purificación de proteínas, por ejemplo, al permitir que la proteína de fusión se aísle y purifique por cromatografía de afinidad, pero también puede utilizarse para aumentar la inmunogenicidad. Las proteínas de fusión pueden producirse al cultivar una célula recombinante transformada con una secuencia de ácido nucleico de fusión que codifica una proteína adherida al extremo carboxilo y/o amino del polipéptido CXCR5. Otros segmentos de fusión pueden incluir, pero sin limitación, regiones F_c de inmunoglobulina, glutatión-S-transferasa, β-galactosidasa, un segmento de polihistidina capaz de unirse a un ión metálico divalente y proteína de unión a maltosa.

[00115] Pueden prepararse moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos por una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagenia mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagenia de PCR y mutagenia de casete de un mutante preparado previamente o de una versión no mutante de la molécula de interés (ver, por ejemplo, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985)).

[00116] La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención, un anticuerpo monocatenario de la invención o una muteína de anticuerpo de la invención) incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo como se describe aquí. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, se puede producir el vector para la producción del anticuerpo por tecnología de ADN

recombinante como se conoce en la técnica. Un vector de expresión se construye de manera que contenga secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Los métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

[00117] El vector de expresión se transfiere a una célula anfitriona por técnicas convencionales y las células transfectadas después se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo o fragmento de la invención. En un aspecto de la invención, pueden coexpresarse vectores que codifican las cadenas pesada y ligera en la célula anfitriona para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla aquí.

[00118] Puede utilizarse una variedad de sistemas de anfitrión/vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Tales sistemas de expresión representan vehículos por medio de los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinantes enteras, comúnmente se usan células bacterianas tales como *E. coli*, y célula eucariotas. Por ejemplo, células de mamífero tales como células CHO, junto con un vector, tal como uno que lleva el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); y Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)). Para preparar las proteínas de interés, como es conocido en la técnica, también pueden utilizarse plantas y cultivo de células vegetales, células de insecto y similares.

[00119] Además, se elige una célula anfitriona que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, división) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse estirpes celulares o sistemas anfitriones apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo expresado de interés. Por lo tanto, pueden utilizarse células anfitrionas eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Estas células anfitrionas de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO,

COS, 293, 3T3 o células de mieloma.

[00120] Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética estirpes celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células anfitrionas pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN externo, puede permitirse el crecimiento de las células modificadas por ingeniería durante uno o dos días en un medio enriquecido, y después se pasan a un medio de selección. El marcador de selección del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en un cromosoma y se expanda en una estirpe celular. Estas estirpes celulares modificadas por ingeniería genética no sólo son útiles para la producción de anticuerpos, sino que también son útiles en la selección y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

[00121] Pueden utilizarse varios sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina cinasa del virus *Herpes simplex* (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)), la selección de glutamato sintasa en la presencia de metionina sulfoxamida (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006 y ver la página web o la bibliografía de Lonza Group Ltd.) y genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, puede utilizarse resistencia antimetabolito como base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido, G-418 (Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Para seleccionar el clon recombinante deseado pueden aplicarse rutinariamente métodos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante, y estos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons (1994); y Colberre-Garapin et al., J Mol Biol 150:1 (1981).

[00122] Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación del vector (por ejemplo, ver Bebbington et al., en DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo se puede amplificar, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo aumentará el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada se asociada con el gen del anticuerpo, también se aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol Cell Biol 3:257 (1983)).

[00123] La célula anfitriona puede cotransfectarse con dos o más vectores de expresión de la invención, por ejemplo, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede utilizarse un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); y Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

[00124] Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por un animal, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por CXCR5 después de cromatografía de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños y así sucesivamente), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas aquí o conocidas en la técnica de otra manera, para facilitar la purificación.

[00125] La proteína CXCR5 recombinante, como se ejemplifica en los ejemplos presentados más adelante, se utiliza para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se seleccionan de los que tenían un potencial terapéutico benéfico, por ejemplo, la prevención de la unión del ligando de CXCR5. Después, los anticuerpos seleccionados se modificaron para obtener propiedades benéficas, tales como una mayor estabilidad *in vivo*.

[00126] Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por

cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales, aunque debido a la modificación de anticuerpos para optimizar el uso en seres humanos, así como para optimizar el uso del anticuerpo per se, se prefieren los anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producción y manipulación de proteínas particulares. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto (Harlow et al., Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

[00127] Por ejemplo, un inmunógeno, como se ejemplifica aquí, puede administrarse a diversos animales anfitriones que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, camélidos, ratas etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para CXCR5. La administración del inmunógeno puede incluir una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de anfitrión, y éstas incluyen, pero no se limitan a, Freund (completo e incompleto), aceite mineral, geles, alumbre (hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana (KLH), dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse por cualquier método que induzca una respuesta inmune en el anfitrión animal elegido. Así, pueden utilizarse diversas vías de administración durante diversos periodos de tiempo según la elección del diseño.

[00128] Típicamente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o intravenosa. El inmunógeno puede incluir un polipéptido CXCR5, una proteína de fusión o variantes de los mismos, que pueden producirse por una célula que produce o sobreproduce CXCR5, que puede ser una célula de ocurrencia natural, una célula mutante de ocurrencia natural o una célula modificada por ingeniería genética. En ciertas circunstancias, pueden utilizarse células enteras que expresan CXCR5. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, el porcentaje de hidrofobia, el porcentaje de hidrofilia, la estabilidad, la carga neta, el punto isoeléctrico etc.), el CXCR5 o la porción del mismo puede modificarse o conjugarse para que sea inmunogénico o más inmunogénico en el animal, tal como un mamífero a inmunizar. Por ejemplo, CXCR5 o una parte del mismo puede conjugarse con un vehículo. La conjugación incluye conjugación química por derivación de

grupos químicos funcionales activos de manera que tanto el inmunógeno como la proteína inmunogénica se conjuguen de manera que se forme un enlace covalente, o por medio de una metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por el experto. Los ejemplos de estos vehículos o proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, KLH, ovalbúmina, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos auxiliares T promiscuos. Para aumentar la respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente pueden utilizarse varios adyuvantes.

[00129] Una vez obtenida una preparación adecuada, es posible aislar anticuerpos particulares de los anticuerpos plurales por técnicas de separación conocidas, tales como cromatografía de afinidad, "panning", absorción y así sucesivamente. De esta manera, puede obtenerse una especie de anticuerpo individual para un estudio adicional, por ejemplo, por secuenciación para obtener las secuencias de aminoácidos de una o más CDR.

[00130] Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente comprenden anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando la tecnología de hibridoma, tal como se describe por Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Patente de Estados Unidos Nº 4.376.110; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) y Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, por ejemplo, preparación y uso de transfectomas; u otros métodos conocidos por el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); y Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pág. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluyen que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de la misma. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

[00131] En el modelo de hibridoma, un anfitrión tal como un ratón, un ratón inmunizado, un ratón transgénico con genes del sistema inmune humano, hámster, conejo, rata, camello o cualquier otro animal anfitrión apropiado, se inmuniza para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente al CXCR5. Como alternativa, los linfocitos puede inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)).

[00132] En general, para preparar hibridomas productores de anticuerpos, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humanas. Las estirpes celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Típicamente se emplea una línea de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si la célula progenitora carece de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[00133] Son estirpes celulares inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable y de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas estirpes celulares de mieloma se encuentran líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. y células SP2/0, FO o X63-Ag8-653 disponibles en la colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

[00134] También se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pág. 51-63 (1987)). También puede utilizarse la estirpe celular de mieloma de ratón NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

[00135] Otra alternativa es usar fusión eléctrica en lugar de fusión química para formar hibridomas. En lugar e fusión, una célula B puede inmortalizarse utilizando, por ejemplo, el virus Epstein Barr u otro gen de transformación, ver, por ejemplo, Zurawaki et al., en Monoclonal Antibodies, ed., Kennett et al., Plenum Press, pág. 19-33. (1980). También pueden utilizarse ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas y ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en los que se han trasplantado linfocitos B humanos.

[00136] El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos

contra CXCR5. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA), análisis fluorocitométrico (FACS) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Estas técnicas son conocidas en este campo y están dentro de la experiencia del especialista. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal por CXCR5 puede determinarse, por ejemplo, por un análisis de Scatchard (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

[00137] Después se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden hacer crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

[00138] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan o se aíslan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, proteína G-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[00139] En la técnica existe una variedad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, de esta manera, la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariota, de fago o procariota.

[00140] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murinos, o tales cadenas de origen humano, humanizado u otras fuentes) (Innis et al. in PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), y Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma sirven como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión que después se introducen por transfección en células anfitrionas tales como células *E. coli*, células NSO, células COS, células de ovario de

hámster chino (CHO) o células de melanoma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y dominios constantes de cadena ligera humana de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) o por medio de la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es una inmunoglobulina puede sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituir a los dominios variables de un sitio de combinación con CXCR5 de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

[00141] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región F_c para prevenir la reticulación en la cadena pesada. Como alternativa, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo aminoacídico o se eliminan para prevenir la reticulación.

[00142] Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconozcan epítopos específicos por técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); y Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Por ejemplo, pueden producirse fragmentos F_{ab} y $F_{(ab')2}$ de la invención por división proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos F_{ab}) o pepsina (para producir fragmentos $F_{(ab')2}$). Los fragmentos $F_{(ab')2}$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse directamente por células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de una colección de anticuerpos en fagos. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos $F_{(ab')2}$-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992). De acuerdo con otra método, pueden aislarse fragmentos $F_{(ab')2}$ directamente a partir del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Para el experto serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento F_v monocatenario (F_v) (documento WO 93/16185).

[00143] Para algunos usos, que incluyen que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible el uso de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos, ver, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); y las Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

[00144] Se derivan los anticuerpos humanizados de moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se unen al CXCR5, en donde una o más CDR se insertan en las regiones FR de una molécula de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en este campo incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EPO 239.400; WO 91/09967; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.225.539; 5,530,101; y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (EPO 592.106; EPO 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); y Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332).

[00145] Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos de una fuente que no es humana. Los residuos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); y Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), al sustituir CDR no humanas o porciones de secuencias de CDR en lugar de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en donde los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen desde sitios análogos en anticuerpos de roedores. La región constante de cadena pesada que puede incluir uno o más dominios de cadena pesada y la región de bisagra pueden proceder de cualquier clase o subclase para obtener el efecto deseado, tal como una función efectora particular.

[00146] A menudo, los residuos de estructura en las regiones de estructura humanas pueden sustituirse por el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, y posiblemente mejorar, la unión a antígenos. Las sustituciones de estructura se identifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las

interacciones de la CDR y los residuos de estructura para identificar residuos de estructura importantes para la unión a antígenos y la comparación de secuencias, para identificar residuos de estructura inusuales en posiciones particulares, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.585.089; y Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

[00147] Además es preferible que los anticuerpos humanizados retengan alta afinidad por CXCR5, y retengan o adquieran otras propiedades biológicas favorables. Así, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas están disponibles comúnmente y los especialistas en la técnica estarán familiarizados con estos métodos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de las presentaciones permite el análisis del papel probable de ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influye en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse al CXCR5. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos FR procedentes del receptor e importarse secuencias de manera que se maximice la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana, aunque son los residuos de la CDR los que influyen directa y más sustancialmente en la unión de CXCR5. Las regiones CDR también pueden modificarse para contener uno o más aminoácidos que varían del obtenido del anticuerpo progenitor a partir del cual se obtiene la CDR, para proporcionar propiedades de interés mejores o diferentes, tales como unión de mayor afinidad o mayor avidez, por ejemplo.

[00148] Ciertas partes de las regiones constantes de un anticuerpo pueden manipularse y cambiarse para proporcionar homólogos, derivados, fragmentos de anticuerpo y similares con propiedades diferentes o mejores que las observadas en el anticuerpo progenitor. De esta manera, por ejemplo, muchos anticuerpos IgG4 forman enlaces disulfuro intracatenarios cerca de la región de bisagra. El enlace intracatenario puede desestabilizar la molécula bivalente progenitora formando moléculas monovalentes que comprenden una cadena pesada con la cadena ligera asociada. Estas moléculas pueden reasociarse, pero en una base aleatoria.

[00149] Se observa que modificar los aminoácidos en la región de bisagra de moléculas de IgG4 puede reducir la probabilidad de formación de enlaces intracatenarios, estabilizando de esta manera la molécula de IgG4, lo cual minimizará la probabilidad de

formar moléculas biespecíficas. Esa modificación será benéfica si un anticuerpo terapéutico es una molécula de IgG4, ya que la mayor estabilidad minimizará la probabilidad de que la molécula se disocie durante la producción y fabricación, así como también *in vivo*. Un anticuerpo monovalente puede no tener la misma eficacia que la molécula progenitora bivalente. Por ejemplo, cuando se administra la IgG4 bivalente a un paciente, el porcentaje de IgG4 bivalente se reduce a aproximadamente 30% durante un periodo de dos semanas. Una sustitución de un aminoácido en la posición 228 intensifica la estabilidad de IgG4. La serina que reside en la posición 228 puede reemplazarse por otro aminoácido, tal como uno de los 19 aminoácidos restantes. Este cambio puede hacerse particularmente con anticuerpos recombinantes en los que la secuencia de ácido nucleico codificante puede mutarse para producir un aminoácido de reemplazo en la posición 228. Por ejemplo, la S puede reemplazarse por una prolina.

[00150] Otra serie de aminoácidos adecuados para la modificación incluyen aminoácidos en el área de la bisagra que afectan a la unión de una molécula que contiene una cadena pesada con la unión al receptor F_c y la internalización del anticuerpo unido. Estos aminoácidos incluyen, en las moléculas IgG1, los residuos de aproximadamente 233 a aproximadamente 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEC ID N°:49) de aproximadamente 252 a aproximadamente 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEC ID N°:50) y de aproximadamente 318 (Glu) a aproximadamente 331 (Pro), incluyendo, por ejemplo, Lys_{320}, Lys_{322} y Pro_{329}.

[00151] Son particularmente convenientes los anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen los métodos de exhibición de fagos descritos anteriormente utilizando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana, ver las Patentes de Estados Unidos N° 4.444.887 y 4.716.111; y las patentes WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. También están disponibles la técnicas de Cole et al. y Boerder et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); y Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

[00152] También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que también expresan ciertos genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad

pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de cadena ligera y pesada humana. Los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de los locus de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos después se reproducen para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos, ver, por ejemplo, Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)).

[00153] Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un CXCR5, por ejemplo, todo o parte de CXCR5, tal como su dominio EC. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR5 a partir de los ratones transgénicos inmunizados utilizando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos, durante la diferenciación de linfocitos B se reordenan, y posteriormente experimentan mutación por cambio de clase y somática. Así, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para revisión, ver Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). Para una discusión de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de protocolos para producir dichos anticuerpos, ver, por ejemplo, la WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; y WO 96/33735; EPO N° 0 598 877; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Adicionalmente, pueden contratarse compañías tales como Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra CXCR5 utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[00154] Además, podrían obtenerse mAb humanos inmunizando ratones en los que se han trasplantado leucocitos de sangre periférica, esplenocitos o médula ósea de origen humano (por ejemplo, por la técnica de trioma de XTL Biopharmaceuticals, Israel). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítopo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada." En ese método, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítopo (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

[00155] Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, pueden retirarse los desechos en forma de partículas, las células anfitrionas o los fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se expone pasta celular a acetato sódico (pH 3,5) y EDTA. El desecho celular puede retirarse por centrifugación. Cuando se secreta al medio la variante de anticuerpo, el sobrenadante de estos sistemas de expresión generalmente primero se concentra utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes extraños.

[00156] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La conveniencia de la proteína A o la proteína G como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de F_c de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. Puede utilizarse la proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Puede utilizarse la proteína G para isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero se dispone de otras matrices. Las matrices estables mecánicamente, tales como el vidrio de poros controlados o poli(estirenodivinil)benceno, permiten flujos más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina agarosa en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo o la variante a recuperar.

[00157] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo o la variante de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH utilizando un amortiguador de elución a

un pH comprendido entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a baja concentración de sal (por ejemplo, una concentración de sal de aproximadamente 0-0,25 M).

[00158] Además, los anticuerpos de la invención, a su vez, pueden utilizarse para generar anticuerpos antiidiotipo que "imitan" al CXCR5 utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Greenspan et al., FASEB J 7:437 (1989); y Nissinoff, J Immunol 147:2429 (1991)). Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos que se unen y que inhiben competitivamente la multimerización y/o unión de un ligando al CXCR5 para generar antiidiotipos que "imitan" al CXCR5 y al dominio de unión y, como consecuencia, se unen y neutralizan CXCR5 y/o su ligando. estos antiidiotipos de neutralización o fragmentos F_{ab} de estos antiidiotipos pueden utilizarse en regímenes terapéuticos, por ejemplo, para neutralizar CXCL13.

[00159] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión se dirige hacia CXCR5, y la otra puede ser para cualquier otro antígeno, tal como una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, ligando, antígeno con especificidad de tejido, proteína derivada de virus, proteína de envoltura codificada por virus, proteína de origen bacteriano, proteína de la superficie bacteriana etc. Así, la otra especificidad podría ser por CXCL13.

[00160] Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., Nature 305:537 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, los hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en la WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991). Se proporcionan otros métodos para obtener anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en Kufer et al., Trends Biotech 22:238-244, 2004.

[00161] Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3}.

Puede ser que la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) contenga el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se utilizan para cotransformar un organismo anfitrión adecuado. Si se desean más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh et al., Meth Enzym 121:210 (1986).

[00162] La presente invención también contempla anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células indeseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, que incluyen los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o por medio de la formación de un enlace tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato, y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

[00163] Además, se pueden generar anticuerpos de un solo dominio contra CXCR5. Se han descrito ejemplos de esta tecnología en laWO9425591 para anticuerpos derivados de la cadena pesada de Ig de camélidos, así como en la US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un solo dominio procedentes de colecciones de fagos.

[00164] Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Bird, Science 242:423 (1988); Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988); y Ward, et al., Nature 334:544 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman por unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región F_v a través de un enlace de aminoácido, dando como resultado un polipéptido monocatenario. También pueden utilizarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos F_v funcionales en *E. coli* (Skerra et al., Science 242:1038 (1988)).

[00165] La presente invención incluye anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como conjugaciones no covalentes) a un polipéptido. Pueden utilizarse anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención para facilitar la purificación, ver, por ejemplo, la WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., Immunol Lett 39:91 (1994); Patente de Estados Unidos N° 5.474.981; Gillies et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); y Fell et al., J

Immunol 146:2446 (1991). La secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otros, de los que muchos están disponibles en el mercado, Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989). Otros marcadores de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, el marcador "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y el denominado marcador "flag".

[00166] También se pueden crear moléculas de unión monocatenaria peptídica en las que se conectan las regiones F_v de cadena pesada y ligera. Se describen anticuerpos monocatenarios ("scF$_v$") y el método de su construcción, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778. Como alternativa, pueden construirse y expresarse F_{ab} por medios similares. Todos los anticuerpos total o parcialmente humanos pueden ser menos inmunogénicos que los mAb completamente murinos, y los fragmentos de anticuerpos monocatenarios también pueden ser menos inmunogénicos.

[00167] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) y Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murinos y humanos, respectivamente, utilizando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). De esta manera, las técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[00168] Los anticuerpos anti-CXCR5 candidatos se ensayan por ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), FACS, inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas conocidas en la técnica. De esta manera, pueden utilizarse células B o células que expresan CXCR5 para detectar la unión de anticuerpos utilizando una técnica conocida, o CXCR5 expresado de manera recombinante, o una parte del mismo, tal como el dominio EC, puede adherirse a una fase sólida y utilizarse como elemento de captura en un ensayo, configurado según la elección del diseño.

[00169] Para determinar si un homólogo de anticuerpo particular se une al CXCR5 humano, puede utilizarse cualquier ensayo de unión convencional. Los ensayos de unión al CXCR5 útiles incluyen análisis FACS, ensayos ELISA, radioinmunoensayos y

similares, que detectan la unión de un anticuerpo, y las funciones resultantes de los mismos, al CXCR5 humano. En estos ensayos son útiles formas de longitud completa y solubles de CXCR5 humano enseñado aquí. La unión de un anticuerpo u homólogo al CXCR5, o a fragmentos solubles del mismo, puede detectarse de manera conveniente por medio del uso de un segundo anticuerpo específico para inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo u homólogo.

[00170] Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular bloquea o no bloquea significativamente la unión de CXCL13 u otro ligando al CXCR5 humano, puede utilizarse cualquier ensayo competitivo adecuado. Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, ensayos ELISA, ensayos FACS, radioinmunoensayos y similares, que cuantifican la capacidad del anticuerpo u homólogo de competir con CXCL13 u otro ligando por la unión al CXCR5 humano. Preferiblemente, se mide la capacidad de un ligando de bloquear la unión de CXCR5 humano marcado a un anticuerpo u homólogo inmovilizado.

[00171] La capacidad de un anticuerpo u homólogo de unirse al CXCR5 humano puede evaluarse ensayando su capacidad de unirse a células $CXCR5^+$ humanas. Son células $CXCR5^+$ adecuadas para uso en la determinación de si un anticuerpo u homólogo particular se une al CXCR5 humano células de cultivo de tejidosd de mamíferos transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y que expresan CXCR5 sobre la superficie celular o estirpes celulares B.

[00172] La unión del anticuerpo u homólogo a la célula $CXCR5^+$ puede detectarse tiñendo las células con un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia específica para inmunoglobulinas de la misma especie de la que procede el homólogo de anticuerpo que se está ensayando. Puede utilizarse un separador de células activadas por fluorescencia ("FACS") para detectar y cuantificar cualquier unión, ver, en general, Shapiro, Practical Flow Cytometry, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. (1985).

[00173] Además, la capacidad de un homólogo de anticuerpo de bloquear la unión de un ligando, tal como CXCL13, al CXCR5 humano puede determinarse preincubando el exceso de ligando con células $CXCR5^+$ y cuantificando el grado en el que el ligando unido bloquea la unión del anticuerpo u homólogo a las células. La unión del anticuerpo u homólogo a las células $CXCR5^+$ puede cuantificarse por análisis FACS utilizando un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia específica para inmunoglobulinas de la misma especie de la que procede el homólogo de anticuerpo que se está ensayando. Como alternativa, puede configurarse un ensayo competitivo utilizando un ligando o anticuerpo marcado como se conoce en la técnica.

[00174] Un ligando, tal como CXCL13, utilizado en los ensayos anteriores

puede proporcionarse por las células transformadas con el gen del ligando, puede ser un CXCL13 aislado, obtenido poniendo en práctica los métodos enseñados aquí, o puede adquirirse en el mercado.

[00175] Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular no produce una reducción significativa en el número de células $CXCR5^+$ circulantes *in vivo*, se cuantifica el número de células $CXCR5^+$ circulantes aisladas a partir de un mamífero en las 24 horas posteriores a la administración del anticuerpo u homólogo a un mamífero que tiene una función inmune normal, y se compara con el número antes de la administración o con el número en un mamífero de control al que se ha administrado un anticuerpo u homólogo de isotipo correspondiente de especificidad irrelevante en lugar de un anticuerpo u homólogo de la presente invención. La cuantificación de células $CXCR5^+$ en animales que han recibido la dosificación de un anticuerpo para CXCR5 o una parte funcional o derivado del mismo puede realizarse, por ejemplo, por teñido de las células obtenidas con anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen a los anticuerpos anti-CXCR5, así como anticuerpos marcados específicos para las células T y las células B, seguido de análisis FACS.

[00176] Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en términos de los epítopos o partes de CXCR5 reconocidas o a las que se une específicamente el anticuerpo. El epítopo o epítopos o la parte o partes de polipéptido pueden especificarse como se describe aquí, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en residuos aminoacídicos contiguos, epítopos conformacionales y así sucesivamente.

[00177] Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de reactividad cruzada. También se incluyen en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos CXCR5, que tienen una identidad de por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 65%, por lo menos 60%, por lo menos 55% y por lo menos 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos aquí) con CXCR5.

[00178] Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de la afinidad de unión a un CXCR5 de interés. Los anticuerpos anti-CXCR5 pueden unirse con una K_D menor de aproximadamente 10^{-7} M, menor de aproximadamente 10^{-6} M, o menor de aproximadamente 10^{-5} M. Pueden ser benéficas mayores afinidades de unión en un anticuerpo de interés, tales como las que tienen una constante de disociación en equilibrio o K_D de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-15} M, de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-12} M, de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} M, o de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-10} M. La

invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítopo de la invención, como se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos aquí. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítopo en por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 60% o por lo menos 50%.

[00179] La presente invención también incluye conjugados que comprenden un anticuerpo de interés. Los conjugados comprenden dos componentes primarios, un anticuerpo de interés y un segundo componente, que puede ser un agente de unión a las células, un agente citotóxico y similares.

[00180] Como se usa aquí, la expresión "agente de unión a célula" se refiere a un agente que reconoce específicamente y se une a una molécula en la superficie de la célula. De esta manera, el agente de unión a célula puede ser un antígeno CD, un antígeno de patógeno, tal como un antígeno de virus, un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer, un antígeno con especificidad de célula, un antígeno con especificidad de tejido, una molécula Ig o de tipo Ig y similares.

[00181] En una realización, el agente de unión a la célula reconoce específicamente CXCL13 o el complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13. El conjugado puede estar en contacto con la célula diana durante un periodo suficiente para permitir que una función efectora del conjugado actúe sobre la célula, y/o para permitir que el conjugado esté durante un periodo suficiente como para la célula lo internalice.

[00182] Los agentes de unión a las células pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se está conociendo, e incluye péptidos, no péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, ligandos, receptores y similares, o combinaciones de los mismos. El agente de unión a las células puede ser cualquier compuesto que puede unirse a una célula, de una manera específica o no específica. Generalmente, el agente puede ser un anticuerpo (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia que se una a las células.

[00183] Otros ejemplos de agentes de unión a las células que pueden utilizarse incluyen: anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales; y fragmentos de anticuerpos tales como F_{ab}, $F_{ab'}$, $F_{(ab')2}$ y F_v (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230 -244 (1960)).

[00184] El segundo componente también puede ser un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se usa aquí se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o crecimiento, de las células y/o produce la destrucción de las células. De esta manera, el agente citotóxico puede ser un taxol, a maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065, una ricina, mitomicina C y similares. En algunas realizaciones, el agente citotóxico, como ocurre con cualquier agente de unión de un conjugado de la presente invención, se une covalentemente, directamente o a través de un ligador escindible o no escindible, a un anticuerpo de interés.

[00185] Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides inhiben la formación de microtúbulos y son muy tóxicos para las células de mamífero.

[00186] Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las Patentes de EEUU Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

[00187] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-descloro (Patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparado, por ejemplo, por reducción con LAH de ansamitocina P2); (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (Patentes de Estados Unidos N° 4.361.650 y 4.307.016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación utilizando Streptomyces o Actinomyces o descloración utilizando hidruro de litio y aluminio (LAH)); y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

[00188] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen: (1) C-9-SH (Patente de Estados Unidos N° 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H2S o P2S5); (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH2OR) (Patente de Estados Unidos N° 4.331.598); (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH_2OH o CH_2OAc) (Patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparado en Nocardia); (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por Streptomyces); (5) C-15-metoxi (Patentes de Estados Unidos N° 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora); (6) C-18-N-desmetil (Patentes de Estados Unidos N° 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y (7) 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos

Nº 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

[00189] Los conjugados citotóxicos se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Para unir un agente citotóxico, fármaco o profármaco al anticuerpo, comúnmente se usa un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados son conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterasas. Por ejemplo, pueden construirse conjugados utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre un anticuerpo de interés y el fármaco o profármaco.

[00190] Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o variante funcional del mismo como se describe aquí, construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de unión al CXCR5 de la presente invención, células anfitrionas que comprenden dicho vector, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido.

[00191] El vector normalmente contiene componentes conocidos en la técnica y generalmente incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes elementos: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores o de selección, secuencias que facilitan y/o mejoran la traducción, un elemento potenciador y similares. De esta manera, los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos unida de manera funcional a dichas secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o la traducción adecuadas tales como las derivadas de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras adicionales incluyen operadores, sitios de unión a ribosomas de ARNm, y/u otras secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción, tales como la iniciación y la terminación. Las secuencias de nucleótidos están "unidas de manera funcional" cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. De esta manera, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a, por ejemplo, la secuencia de la cadena pesada de anticuerpo si la secuencia promotora controla la transcripción de esa secuencia de nucleótidos.

[00192] Además, en los vectores de expresión pueden incorporarse secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están asociados de manera natural con las secuencias de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder de secreción) puede fusionarse en fase con la secuencia polipeptídica de manera que el anticuerpo se secrete en el espacio periplásmico o al medio. Un péptido señal que es funcional en la célula anfitriona deseada aumenta la

secreción extracelular del anticuerpo apropiado o de una parte del mismo. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo por la célula. Los ejemplos de estas señales de secreción son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

[00193] El vector puede ser un plásmido, un vector viral monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario o un vector de fago de ADN, un fagémido, un cósmido o cualquier otro vehículo de un transgén de interés. Estos vectores pueden introducirse en las células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para introducir ADN o ARN en las células. Los vectores, en el caso de los vectores de fago y virales, también pueden introducirse en las células como virus empaquetados o encapsulados por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso, generalmente sólo tendrá lugar la propagación viral en la complementación de células anfitrionas y en el uso de vectores plurales que llevan los diversos componentes de virus necesarios para producir una partícula. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir la proteína utilizando ARN derivados de las presentes construcciones de ADN (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos N° 5.122.464).

[00194] Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en cualquier célula anfitriona adecuada. Los ejemplos de células anfitrionas útiles en la presente invención incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores e incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Serratia y Shigella, así como bacilos, Pseudomonas y Streptomyces) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo de interés; levaduras (por ejemplo, Saccharomyces, Pichia, Actinomycetes, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida, Trichoderma, Neurospora y hongos filamentosos tales como Neurospora, Penicillium, Tolypocladium y Aspergillus) transformados con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, Baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; o virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de

mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5K del virus vaccinia).

[00195] Los vectores de expresión para uso en células anfitrionas procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípicos. Un gen marcador de selección fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que proporciona un requisito autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células anfitrionas procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) y la serie de vectores pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); y Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Las secuencias de promotor utilizadas comúnmente para vectores de expresión de células anfitrionas procariotas recombinantes incluyen el sistema promotor de T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)), de β-lactamasa (penicilinasa) y de lactosa (Chang et al., Nature 275:615 (1978); y Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), y el promotor tac (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

[00196] Los vectores de levadura a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación, tal como el del plásmido de levadura 2μ, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para los vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Se describen otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras se describen en Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y para los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de estos protocolos se describe por Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), que selecciona transformantes Trp^+ en un medio selectivo.

[00197] Se puede utilizar cualquier cultivo de células eucariotas, ya sea un cultivo de células de vertebrados o de invertebrados. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pág. 277-9, Plenum Publishing (1986); y Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Por ejemplo, pueden utilizarse sistemas de Baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, puede utilizarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Otros anfitriones que se han identificado incluyen Aedes, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*. Están disponibles para el público varias cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de AcNPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV. Además, también pueden utilizarse como anfitriones los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco, como se conoce en la técnica.

[00198] Los cultivos de las células de vertebrados y para la propagación de las células de vertebrados (cultivo tisular) pueden realizarse por medio de un procedimiento rutinario, aunque existen estirpes celulares fastidiosas que requieren, por ejemplo, un medio especializado con factores únicos, células de alimentación y similares, véase Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Son ejemplos de estirpes celulares anfitriónanfitrionacélulas anfitrionas de mamífero útiles riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino/-DHFR (ÇHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón; células de carcinoma cervical humano (por ejemplo, HeLa); células de riñón de perro; células de pulmón humano; células hepáticas humanas; tumor mamario de ratón; y células NSO.

[00199] Las células anfitrionas se transforman con vectores para la producción de anticuerpo y se cultivan en medio nutriente convencional que contiene factores de crecimiento, vitaminas, minerales y similares, así como inductores apropiados para las células y los vectores usados. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras utilizadas comúnmente proceden del virus de polioma, Adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Pueden utilizarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula anfitriona de mamífero, por ejemplo, el origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, sitios de corte y empalme y

poliadenilación. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles porque se obtienen fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral. Están disponibles en el mercado vectores de expresión ejemplares para uso en células anfitrionas de mamífero.

[00200] Para el cultivo de las células anfitrionas son adecuados medios disponibles en el mercado tales como medio F10 de Ham, Medio Esencial Mínimo (MEM), RPMI-1640 y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979) y Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), y en las Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 puede utilizarse como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios puede suplementarse cuando sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros, tales como cloruro de sodio, calcio o magnesio; y fosfatos), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas, según la elección del diseño. Las condiciones de cultivo tales como la temperatura, el pH y similares, son las conocidas en la técnica apropiada para la célula y las que permiten la expresión deseada del transgén.

[00201] Los polinucleótidos de interés pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)) y después amplificando los oligonucleótidos ligados, por ejemplo, por PCR.

[00202] Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una célula que lo expresa. Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada, tal como una colección, que puede ser una específica para las células productoras de anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención. Pueden configurarse cebadores adecuados para la amplificación por PCR. Los ácidos nucleicos amplificados

generados por PCR después pueden clonarse en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido en la técnica.

[00203] Una vez que se han determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse para obtener los equivalentes de interés descritos aquí utilizando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagenia dirigida, PCR etc. (ver, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998) para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

[00204] La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o de cadena ligera puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por métodos bien conocidos, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. utilizando técnicas de ADN recombinantes rutinarias, una o más de las CDR pueden insertarse dentro de regiones de estructura, por ejemplo, en regiones de estructura humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se ha descrito *supra*. El polinucleótido de interés generado por la combinación de las regiones de estructura y una o más CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al CXCR5, o por lo menos el dominio ED del mismo. Por ejemplo, estos métodos pueden utilizarse para realizar sustituciones o eliminaciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios.

[00205] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden utilizarse para detectar CXCR5, y por lo tanto células que expresan CXCR5, en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el anticuerpo anti-CXCR5 de la invención se usa para determinar la presencia y el nivel de CXCR5 en un tejido o en células derivadas del tejido. Los niveles de CXCR5 en el tejido o biopsia pueden determinarse, por ejemplo, en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o la biopsia de éste puede ser congelado o fijado. Estos mismos u otros métodos pueden utilizarse para determinar otras propiedades de CXCR5, tales como su nivel, la localización celular, los niveles de ARNm, sus mutaciones y similares.

[00206] El método descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para

diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o que se sospecha que tiene un cáncer, donde el nivel de CXCR5 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto de referencia normal o patrón. El ensayo de interés también puede utilizarse para diagnosticar artritis u otra enfermedad autoinmune caracterizada por infiltración y concentración de células B, junto con el desarrollo de tejido linfoide diferenciado.

[00207] La presente invención además proporciona anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítopos de los mismos que están marcados adicionalmente para uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En algunas realizaciones, el marcador es un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ion metálico.

[00208] También se proporciona un método de diagnóstico en el que dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión a epítopo de los mismos se administran a un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, artritis, enfermedades autoinmunes u otra enfermedad asociada con CXCR5, y se mide o se controla la distribución del marcador dentro del cuerpo del sujeto.

[00209] El anticuerpo y los fragmentos del mismo de la presente invención pueden utilizarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de dextrano o de agarosa o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene CXCR5 o células que lo llevan que se van a purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el CXCR5 o la célula a purificar, que están unidas al anticuerpo inmovilizado de interés. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como amortiguador glicina, pH 5,0, que liberará el CXCR5 o la célula del anticuerpo de interés.

[00210] Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo de interés típicamente se marcará con un marcador detectable. Se dispone de numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como ^{36}S, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H y ^{131}I (el anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo utilizando técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse utilizando recuento de centelleo); (b) marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo de texas, pudiendo conjugarse los marcadores fluorescentes con el anticuerpo utilizando una técnica descrita en Current Protocols in Immunology, *supra*, por

ejemplo, donde la fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro; y (c) diversos marcadores de sustratos enzimáticos que están disponibles (la Patente de Estados Unidos Nº 4.275.149 proporciona una revisión), catalizando generalmente la enzima una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas, por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente, o la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia, por ejemplo, utilizando un luminómetro, o el marcador dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos Nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos en O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

[00211] Cuando se usan estos marcadores, se dispone de sustratos adecuados, tales como: (i) en el caso de la peroxidasa de rábano picante, se usa hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, clorhidrato de ortofenilen diamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB)); (ii) en el caso de la fosfatasa alcalina (AP), se usa p-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico tal como 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa.

[00212] Los especialistas en la técnica disponen de otras combinaciones de enzima-sustrato. Como revisión general, véanse las Patentes de Estados Unidos Nº 4.275.149 y 4.318.980.

[00213] Algunas veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de los indicadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de esta manera, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esa manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta del marcador, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores o indicadores mencionados

anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-digoxina. De esta manera, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo o muteína utilizando un segundo anticuerpo.

[00214] En otra realización de la invención, el anticuerpo no necesita marcarse, y su presencia puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo, otra forma de segundo anticuerpo.

[00215] Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

[00216] Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado de competir con la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición. Como resultado, el patrón y la muestra de ensayo que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y las muestras de ensayo que permanecen sin unir.

[00217] Los ensayos de tipo captura implican el uso de dos anticuerpos, siendo cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, determinante o epítopo, de el objetivo a detectar. En un ensayo de tipo captura, la muestra de ensayo a analizar se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza directa o indirectamente en un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo marcado directa o indirectamente se une a la muestra de ensayo unida, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado a su vez con un resto detectable (ensayo de tipo captura directo) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina u otro miembro adecuado del par de unión (anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, enzima/sustrato, por ejemplo) que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo captura indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo captura es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

[00218] Para inmunohistoquímica, la muestra de célula o de tejido puede ser reciente o puede estar congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante tal como, por ejemplo, formalina.

[00219] Los anticuerpos también pueden utilizarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el mutante de anticuerpo se marca con un radionucleótido

(tal como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) de manera que puedan localizarse los sitios que expresan CXCR5 utilizando inmunoescintografía.

[00220] La presente invención también incluye kits, por ejemplo, que comprenden un anticuerpo, fragmento del mismo, homólogo, derivado del mismo y similares, tales como un conjugado marcado o citotóxico, e instrucciones para uso del anticuerpo, conjugado para destruir tipos celulares particulares y similares. Las instrucciones pueden incluir orientaciones para usar el anticuerpo, conjugado y similares *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El anticuerpo can estar en forma líquida o como un sólido, generalmente liofilizado. el equipo puede contener otros reactivos adecuados tales como un amortiguador, una solución de reconstitución y otros ingredientes necesarios para el uso deseado. Se contempla una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso, tal como para el uso terapéutico o para realizar un ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado, tal como con una enzima, el equipo puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse para proporcionar concentrados de una solución de reactivo que proporciona flexibilidad al usuario, economía de espacio, economía de reactivos y similares. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes, que tras la disolución proporcionan una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

[00221] Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un mamífero. En una realización, el anticuerpo o equivalente de interés se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos ejemplares a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Estos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo, o pueden utilizarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de la dosis en el mamífero.

[00222] Un anticuerpo con o sin un segundo componente, tal como un resto terapéutico conjugado con el mismo, administrado solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos puede utilizarse como agente terapéutico. La presente invención se refiere a terapias basadas en anticuerpos que implican administrar anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno

o afección mediada por CXCR5. El animal o sujeto puede ser un mamífero que necesita un tratamiento particular, tal como un mamífero al que se le ha diagnosticado un trastorno particular, por ejemplo, uno relacionado con CXCR5. Los anticuerpos dirigidos contra CXCR5 son útiles, por ejemplo, para la profilaxis o tratamiento de artritis, enfermedades inflamatorias, en general, rechazo de injertos, cáncer y trastornos autoinmunes. Por ejemplo, por medio de la administración de una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo anti-CXCR5 de la presente invención, o una mezcla de una pluralidad de los anticuerpos de la presente invención o equivalentes de los mismos, o en combinación con otros anticuerpos de diversos orígenes, pueden mejorarse o prevenirse síntomas de enfermedades en el animal tratado, en particular en seres humanos.

[00223] Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos, equivalentes y derivados de los mismos como los descritos aquí) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como los descritos aquí (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos) y anticuerpos antiidiotipo como los descritos aquí. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con una expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, que incluyen, pero no se limitan a, una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas aquí. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5 incluye, pero sin limitación, el alivio de por lo menos un síntoma asociado con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica o como se describe aquí. La expresión "fisiológicamente aceptable," "farmacológicamente aceptable" y similares significa aprobado por la agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal o como se indica en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales y más particularmente en seres humanos.

[00224] El anticuerpo anti-CXCR5 puede administrarse a un mamífero de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, la vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, inhalación y oral, y si se desea para el tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, a través de la mucosa

oral, la mucosa rectal e intestinal etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. la administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluyen inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por medio de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Además, el anticuerpo se administra convenientemente por infusión pulsátil, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administra por inyección, preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

[00225] Se conocen otros sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); y Lopez-Berestein, ibid., p. 317-327) y células recombinantes capaces de expresar el compuesto; endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)); construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector etc.

[00226] Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coascervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osal, Ed. (1980).

[00227] También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, por medio del uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. El anticuerpo también puede administrarse en los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.514.496.

[00228] En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; lo cual puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o

gelatinoso, que incluyen membranas tales como membranas silásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales que no absorban o adsorban la proteína.

[00229] En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); y Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer et al., eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983); véase también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann Neurol 25:351 (1989); y Howard et al., J Neurosurg 71:105 (1989)). En otra realización, puede ponerse un sistema de liberación controlada cerca de el objetivo terapéutica.

[00230] Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" opcionales empleados típicamente en la técnica, es decir, agentes amortiguantes, agentes estabilizantes, conservantes, agentes de isotonicidad, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, ed. (1980). Estos aditivos generalmente son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, por lo tanto, los excipientes, diluyentes, vehículos y similares son farmacéuticamente aceptables.

[00231] Un anticuerpo "aislado" o "purificado" carece sustancialmente de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la célula o tejido original o del medio del que procede la proteína, o carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el polipéptido/proteína está separado de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. De esta manera, un anticuerpo que carece sustancialmente de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% (en peso seco) de la proteína contaminante. Cuando el anticuerpo se produce de manera recombinante, también carece preferiblemente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de

aproximadamente 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, preferiblemente carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos y reactivos, es decir, el anticuerpo de interés se separa de precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, estas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos se aíslan o purifican.

[00232] Como se usa aquí, la expresión "niveles de bajos a indetectables de agregación" se refiere a muestras que contienen no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% y con frecuencia no más de 0,5% de agregación, por peso de proteína, medido, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución (HPSEC).

[00233] Como se usa aquí, la expresión "niveles de bajos a indetectables de fragmentación" se refiere a muestras que contienen una cantidad igual o mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, de la proteína total, por ejemplo, en un solo pico, como se determina por HPSEC, o en dos (2) picos (cadena pesada y cadena ligera), por ejemplo, por electroforesis capilar en gel reducido (rCGE) y que no contiene ningún otro pico individual con más de 5%, más de 4%, más de 3%, más de 2%, más de 1% o más de 0,5% de la proteína total. La rCGE como se usa aquí se refiere a electroforesis capilar en gel en condiciones reductoras suficientes para reducir enlaces disulfuro en un anticuerpo o molécula de tipo anticuerpo o derivada de un anticuerpo.

[00234] Como se usa aquí, los términos "estabilidad" y "estable", en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo para CXCR5 o un fragmento de unión del mismo, se refieren a la resistencia del anticuerpo o del fragmento de unión a antígenos del mismo en la formulación al desplegamiento térmico o químico, agregación, degradación o fragmentación en unas condiciones específicas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones "estables" de la invención retienen una actividad biológica igual o mayor de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% en unas condiciones específicas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. La estabilidad de dicha preparación de anticuerpo puede evaluarse por grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, rCGE, electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia.

[00235] El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante,

excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Estos vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen los procedentes del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo adecuado cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente en caso de soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguantes del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, depósitos y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Se describen ejemplos de vehículos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Como se conoce en la técnica, la formulación se construirá para adecuarse al modo de administración.

[00236] Los agentes amortiguantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Los amortiguadores están presentes preferiblemente a un intervalo de concentraciones de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes amortiguantes adecuados para uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos, y sales de los mismos, tales como amortiguadores citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico etc.), amortiguadores succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico etc.), amortiguadores tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico etc.), amortiguadores fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico,

mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico etc.), amortiguadores gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico etc.), amortiguadores oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico etc.), amortiguadores lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico etc.) y amortiguadores acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico etc.). Pueden utilizarse amortiguadores fosfato, amortiguadores carbonato, amortiguadores de histidina, sales de trimetilamina tales como Tris, HEPES y otros de estos amortiguadores conocidos.

[00237] Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades que varían de 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

[00238] Están presentes agentes de isotonicidad para asegurar la isotonicidad fisiológica de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcohol de azúcares polihidroxílicos, preferiblemente alcoholes de azúcares trihidroxílicos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los alcoholes polihidroxílicos pueden estar presentes en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25%, en peso, preferiblemente de 1% a 5% teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes.

[00239] Los estabilizantes se refieren a una categoría amplia de excipientes que pueden cambiar en función de un agente para proporcionar volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihidroxílicos; aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, arabitol, eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, que incluyen ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico,

tioglicerol, α-monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, sacáridos, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano y similares. Los estabilizantes están presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 p/p por parte de proteína activa.

[00240] Otros diversos excipientes incluyen agentes para proporcionar volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina o vitamina E) y codisolventes.

[00241] La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo cuando sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente los que tienen actividades complementarias que no interfieren de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Estas moléculas convenientemente están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin para el que están destinadas.

[00242] Como se usa aquí, el término "tensioactivo" se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, particularmente se componen de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos a menudo se usan como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

[00243] Pueden añadirse tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger al agente terapéutico frente a la agregación inducida por agitación, lo cual también permite que la formulación se exponga a tensiones de cizalla en la superficie sin que se produzca desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80 etc.), poloxámeros (184, 188 etc.), polioles Pluronic® y monoéteres de polioxietileno sorbitano (TWEEN-20®, TWEEN-80® etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

[00244] Como se usa aquí, la expresión "sal inorgánica" se refiere a

cualquier compuesto, que no contiene carbono, que resulta del reemplazo de parte o todo el hidrógeno ácido o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal, y a menudo se usa como un compuesto que ajusta la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH_2PO_4 etc.

[00245] La presente invención proporciona formulaciones líquidas de un compuesto de unión a anti-CXCR5 o un fragmento del mismo, que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, o de aproximadamente 5,5 a 6,5, o de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, o de aproximadamente 6,0.

[00246] La presente invención incluye formulaciones líquidas que tienen estabilidad a temperaturas encontradas en un refrigerador y congelador comercial como el encontrado en la oficina de un médico o en un laboratorio, tal como de aproximadamente -20° C a aproximadamente 5° C, evaluándose dicha estabilidad, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC), con fines de almacenamiento, tal como durante aproximadamente 60 días, durante aproximadamente 120 días, durante aproximadamente 180 días, durante aproximadamente un año, durante aproximadamente 2 años o más. Las formulaciones líquidas de la presente invención también presentan estabilidad, como se evalúa, por ejemplo, por HSPEC, a temperatura ambiente, durante por lo menos unas pocas horas, tal como una hora, dos horas o aproximadamente tres horas antes del uso.

[00247] La expresión "molécula pequeña" y expresiones análogas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluyen compuestos heteroogánicos y/o ganometálicos) que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1.00 gramo por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

[00248] De esta manera, en el caso de un cáncer, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos para cánceres, que incluyen agentes quimioterapéuticos convencionales (paclitaxel, carboplatino, cisplatino y doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinib, erlotinib y cetuximab), agentes anti-angiogenia (bevacizumab y sunitinib), así como agentes inmunomoduladores tales como

interferón-α y talidomida.

[00249] En otra realización, en el caso de enfermedades reumáticas, tal como artritis reumatoide (RA), se puede utilizar una terapia de combinación que comprende una molécula de unión al CXCR de interés. Por ejemplo, un anticuerpo CXCR5 humanizado puede ser dosificada con una molécula pequeña, tal como un fármaco antirreumático que modifica la enfermedad, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, inhibidores de síntesis de piridina y metrotocsato, tal como, leflunomida (Mader & Keystone, J Rheum 34 Supp(16-24) 2007,Gaffo et al., Am J Health Syst Phann 63-2451-2465, 2006).

[00250] Debido a varias formas de una molécula de de unión al CXCR5 de interés pueden no ser moléculas que agotan la célula B, la presente molécula se puede combinar con otros fármacos que tiene mecanismos trasladantes de acción para producir un punto final aditivo o sinérgico. Por lo tanto, por ejemplo, un segundo fármaco puede ser uno que actúe en el nivel de una citosina, en el eje de la célula T y así sucesivamente.

[00251] Como se usa aquí, las expresiones "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente que pueda utilizarse en el tratamiento, curación o mejoría de una enfermedad, trastorno, malestar y similar asociado con un metabolismo y actividad aberrante de CXCR5 y/o CXCL13. Esto puede manifestarse en niveles anómalos de células B o en una actividad anómala de células B. También se incluyen compuestos conocidos con un efecto farmacológico en el tratamiento de un trastorno y similares que está asociado con el metabolismo y actividad aberrante de CXCR5 y/o CXCL13.

[00252] Además, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas, ver, por ejemplo, los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de Estados Unidos N° 5.314.995; y documento EPO 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo (por ejemplo, emisores α tales como, por ejemplo, ^{213}Bi). Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracendiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos y homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo y dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina,

clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, daunomicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, actinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

[00253] Las técnicas para conjugar este resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas, ver, por ejemplo, Arnon et al., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., en Controlled Drug Delivery, 2ª ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985); y Thorpe, et al., Immunol Rev 62:119 (1982). Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo, tal como un anticuerpo bifuncional, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980.

[00254] Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y el agente terapéutico o resto de fármaco no debe considerarse limitado a los agentes quimioterapéuticos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I (documento WO 97/33899), AIM II (documento WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., Int Immunol, 6:1567 (1994)), VEGF (documento WO 99/23105); un agente trombótico; un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF) u otros factores de crecimiento.

[00255] Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración utilizando un filtro de 0,2 μm o de 0,22 μm.

[00256] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los

ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o matrices. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque ciertos polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando residuos sulfhidrilo, por liofilización de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, por sustitución de aminoácidos y creando composiciones de matrices poliméricas específicas.

[00257] La composición de anticuerpo o de variante se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos especialistas. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o variante a administrar vendrá dictada por estas consideraciones, y puede ser la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por CXCR5.

[00258] El anticuerpo o variante, opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores discutidos anteriormente. Generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con las vías de administración utilizadas anteriormente aquí o de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[00259] Como se usa aquí, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad mediada por CXCR5, mejorar uno

o más síntomas de dicha enfermedad, prevenir el avance de una enfermedad mediada por CXCR5 o causar la regresión de una enfermedad mediada por CXCR5, o que es suficiente para prevenir el desarrollo, recurrencia, inicio o progresión de una enfermedad mediada por CXCR5 o uno o más síntomas de la misma, o mejorar o potenciar los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad mediada por CXCR5. Por ejemplo, un tratamiento de interés puede reducir los niveles elevados de células B, basándose en un nivel basal o normal, por lo menos 5%, preferiblemente por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 100%. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente terapéutico o profiláctico reduce los síntomas de una enfermedad mediada por CXCR5, tal como artritis o rechazo de injerto por lo menos 5%, preferiblemente por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 100%. También se usa aquí como equivalente la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz".

[00260] La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será eficaz en el uso o tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Cuando sea posible, debe realizarse una curva de dosis-respuesta y las composiciones farmacéuticas de la invención primero deben prepararse *in vitro*. Si se dispone de un modelo animal adecuado, de nuevo puede obtenerse una curva de dosis-respuesta y utilizarse para extrapolar una dosis humana adecuada poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, basándose en el conocimiento común de la técnica, una composición farmacéutica eficaz para promover una disminución de un efecto inflamatorio, por ejemplo, puede proporcionar una concentración local de agente terapéutico comprendida entre aproximadamente 5 y 20 ng/ml, y preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 ng/ml. En otra realización específica de la invención, una composición farmacéutica eficaz para mejorar el crecimiento y la supervivencia de células responsables de manifestaciones autoinmunes dependientes de células B o del rechazo de injertos puede proporcionar una concentración local de agente terapéutico comprendida entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 ng/ml.

[00261] En una realización preferida, puede administrarse una solución acuosa del polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo por inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación puede determinarse empíricamente para la enfermedad particular, la población de pacientes, el modo de administración y similares, poniendo en práctica métodos farmacéuticos conocidos en la técnica.

[00262] El programa de dosificación para administración subcutánea puede variar de una vez por semana a diariamente dependiendo de varios factores clínicos que incluyen el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

[00263] La presente invención proporciona métodos para preparar formulaciones líquidas del anticuerpo o fragmento de unión al CXCR5 del mismo, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción de anticuerpo purificado a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml o mayor utilizando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un límite de peso molecular (pm) apropiado (por ejemplo, un límite de 30 kD para fragmentos $F_{(ab')2}$; y un límite de 10 kD para fragmentos F_{ab}) y, opcionalmente, diafiltrar la fracción de anticuerpo concentrada en el amortiguador de formulación utilizando la misma membrana.

[00264] Además, la presente invención también incluye formulaciones líquidas estables de los productos de interés que tienen una mejor vida media *in vivo*. De esta manera, el anticuerpo de interés tiene una vida media en un sujeto, preferiblemente a ser humano, mayor de 3 días, mayor de 7 días, mayor de 10 días, mayor de 15 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses, mayor de 5 meses o mayor.

[00265] Para prolongar la circulación en suero de un anticuerpo *in vivo*, pueden utilizarse varias técnicas. Por ejemplo, pueden unirse moléculas de polímero inerte, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, a un anticuerpo con o sin un ligador multifuncional por medio de una conjugación con especificidad de sitio del PEG al extremo N o al extremo C del anticuerpo o a través de grupos ε amino presentes en residuos

de lisina. Puede utilizarse derivación de polímeros lineal o ramificada que ocasiona una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede controlarse de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados con PEG pueden ensayarse con respecto a la actividad de unión así como con respecto a la eficacia *in vivo* utilizando métodos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos descritos aquí.

[00266] También puede generarse un anticuerpo con una mayor vida media *in vivo* introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a F_cR del mismo (tal como un fragmento de F_e o un fragmento de dominio F_e de bisagra), ver, por ejemplo, los documentos WO 98/23289; WO 97/34631; y la Patente de Estados Unidos N° 6.277.375.

[00267] Además, un anticuerpo puede conjugarse con albúmina para hacer que el anticuerpo sea más estable *in vivo* o tenga una mayor vida media *in vivo*. Las técnicas son conocidas en este campo, véanse por ejemplo los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y EPO 413. 622. El anticuerpo también puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, división proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, y similares.

[00268] En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también incluye un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína u otro anestésico "caína" para evitar el dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, por ejemplo, en un kit, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00269] La invención también prevé que una formulación líquida de la presente invención se envase en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del producto de interés. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden estar en un recipiente cerrado herméticamente que indique la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida de la presente invención puede suministrarse en un recipiente cerrado herméticamente con por lo menos 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml de anticuerpo para CXCR5 en una cantidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, por ejemplo.

[00270] Se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz en el diagnóstico, prevención o tratamiento de una afección o enfermedad mediada por CXCR5 y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en o asociada con el recipiente indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección particular. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[00271] En otro aspecto de la invención, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, por medio de terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable de interés. En una realización de la invención, los ácidos nucleicos producen la proteína codificada en y por células anfitrionas diana que median un efecto terapéutico. De acuerdo con la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles.

[00272] Como revisión general de los métodos de terapia génica, véase

Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488 (1993); Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991); Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573 (1993); Mulligan, Science 260:926 (1993); Morgan et al., Ann Rev Biochem 62:191 (1993); y May, TIBTECH 11:155 (1993).

[00273] En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, o fragmentos de unión funcionales del mismo, siendo parte dichas secuencias de ácido nucleico de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras del mismo en un anfitrión adecuado. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y opcionalmente, especifico de tejido, así como otras secuencias reguladoras.

[00274] En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada se flanquean por regiones que promueven recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:8932 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435 (1989)). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; como alternativa, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo. Otros métodos alternativos de integración incluyen el uso de factores de transcripción particulares que reconocen secuencias de ácido nucleico específicas, dedos de cinc y similares.

[00275] La administración de los ácidos nucleicos a un paciente puede realizarse de manera directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o a vectores que llevan el ácido nucleico, o de manera indirecta, en cuyo caso primero se transforman células con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después se trasplantas estas células al paciente.

[00276] En una realización, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo* y es de esperar que produzcan el producto codificado. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyendo secuencias codificantes del anticuerpo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrando dichas secuencias de manera que los vectores sean intracelulares, por ejemplo, por infección utilizando vectores retrovirales atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), por inyección indirecta de ADN desnudo, por medio del uso de bombardeo de micropartículas (por

ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), utilizando vectores no virales tales como composiciones sintéticas que comprenden un compuesto anfipático que se une al ácido nucleico hidrófilo y tiene la capacidad de fusionarse con las células, conteniendo generalmente de esta manera una parte hidrófoba para combinar con las membranas, por recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, por administración del vector en asociación con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, por administración del vector en asociación con un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)) (que puede utilizarse para fijar como objetivo tipos celulares que expresan específicamente los receptores) etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo el ácido nucleico evitar la degradación lisosomal. En otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y la expresión con especificidad de célula, por medio de la dirección a un receptor específico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188 y WO 93/20221).

[00277] En relación con los vectores, por ejemplo, puede utilizarse un vector lentiviral como se conocen en la técnica. Los vectores lentivirales contienen componentes para empaquetar el genoma viral y para la integración en el ADN de la célula anfitriona. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, que facilitan la liberación del gen en un paciente. Por ejemplo, puede utilizarse un vector lentiviral para administrar un transgén a células madre hematopoyéticas. Las referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., J Clin Invest 93:644 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467 (1994); Salmons et al., Human Gene Therapy 4:129 (1993); y Grossman et al., Curr Opin Gen and Dev 3:110 (1993).

[00278] En la presente invención también pueden utilizarse adenovirus. Las dianas para los sistemas de liberación basados en adenovirus son hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo, por ejemplo. Los adenovirus infectan a células que no se están dividiendo, una ventaja con respecto a los vectores retrovirales anteriores. Kozarsky et al., Curr Opin Gen Dev 3:499 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus vectores para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Pueden encontrarse otros casos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld et al., Science 252:431 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143 (1992); Mastrangeli et al., J Clin Invest 91:225 (1993); documento WO94/12649; y Wang et al., Gene Therapy 2:775 (1995).

[00279] También pueden utilizarse en terapia génica virus adenoasociados (AAV) (Walsh et al., Proc Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); y las Patentes de Estados Unidos Nº 5.436.146; 6,632,670; y 6.642.051.

[00280] Otra estrategia de terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejidos por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células después se ponen bajo selección para aislar las células que se han captado y que expresan el gen transferido. Esas células después se administran a un paciente.

[00281] De esta manera, el ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, que incluyen pero sin limitación transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos etc. En este campo se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células (ver, por ejemplo, Loeffler et al., Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen et al., Meth Enzymol 217:618 (1993); y Cline Pharm Ther 29:69 (1985)) y pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, siempre que no se alteren el desarrollo y las funciones fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe permitir la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico se exprese por la célula, se pueda heredar y se exprese por la descendencia de la célula.

[00282] Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o células progenitoras) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para el uso depende del efecto deseado, el estado del paciente etc., y puede determinarse por un experto.

[00283] Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia génica incluyen cualquier tipo celular disponible deseado e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células progenitoras o células madre hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal etc.

[00284] En una realización, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención se introducen en células de tal manera que el transgén se exprese por las células o su descendencia, y las células recombinantes después se administran *in vivo* para conseguir un efecto terapéutico. En una realización específica se usan células madre o progenitoras. De acuerdo con la realización de la presente invención puede utilizarse cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (ver, por ejemplo, el documento WO 94/08598; Stemple et al., Cell 71:973 (1992); Rheinwald Meth Cell Bio 21A:229 (1980); y Pittelkow et al., Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)). Como CXCR5 se expresa, por ejemplo, en células B, son células anfitrionas adecuadas células sanguíneas y células de médula ósea. Sin embargo, el alcance de la presente invención en relación con el uso de células madre como anfitriones no contempla la preparación y uso de un transgén para obtener un organismo transgénico por medio de la administración del transgén de interés a embriones y células madre embrionarias.

[00285] La invención proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de enfermedades mediadas por CXCR5 o uno o más síntomas de las mismas, por medio de la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de, por ejemplo, una formulación líquida de la invención. El sujeto es preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono, tal como un macaco y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

[00286] CXCR5 también se expresa en ciertas células neoplásicas, tales como de páncreas, colon y vejiga, así como en leucemias de células T (Qinping et al., Oncogene 24:573-584, 2005) y leucemias de células B (Burkel et al., Blood, Jul 2007; doi:10.1182/blood-2007-05-089409) y la estimulación de CXCR5 se correlaciona con la proliferación de células de carcinoma, Meijer et al., Canc Res 66:9576-9582, 2006.

[00287] De esta manera, el anticuerpo o derivado del mismo de interés puede utilizarse para controlar la proliferación de células neoplásicas que expresan CXCR5, identificándose esos cánceres por medio de la determinación de la presencia de expresión de CXCR5 por medio de un ensayo de diagnóstico enseñado aquí. El anticuerpo de interés puede reducir la infiltración de células malignas, reducir la resistencia a la apoptosis y minimizar la proliferación. A estos pacientes entonces se les administra una cantidad inhibidora de la proliferación de células neoplásicas de un anticuerpo, o derivado del mismo, de interés como el que se proporciona aquí.

[00288] Algunos trastornos autoinmunes están asociados con una expresión

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

[00289] Se observa una expresión aberrante de CXCR5 en la esclerosis múltiple, Brain 129(Pt 1)200-211, 2006.

[00290] En la colitis, CXCR5 tiene una función en la formación y función de GALT (Carlsen et al., Gut, 2002, 51(3)364-367). La migración e infiltración mediada por CXCR5 de células B en la lámina propia del intestino, y la infiltración en la mucosa en general, (Mazzucchelli et al., J Clin Invest, 1999, 104(10)R49-R54) y su expresión en lesiones de colitis ulcerosa que contienen centros germinales ectópicos, se inhibe por un anticuerpo de interés.

[00291] La reducción de células B tiene un efecto terapéutico beneficioso en la mejora de los síntomas de la artritis reumatoide (Oligino & Dalrymple, Arth Res Ther 5(Suppl 4)S7-S11, 2003). CXCR5 se expresa a altos niveles en el tejido sinovial de pacientes con artritis, en comparación con tejidos de individuos que no padecen artritis reumatoide (Schmutz et al., Arth Res Ther 7:R217-R229, 2005). De esta manera, el anticuerpo de la presente invención puede prevenir la infiltración y la interacción de las células B en una articulación. Por consiguiente, el tratamiento incluye la administración de una cantidad reductora del nivel de células B de un anticuerpo de interés a un paciente al que se le ha diagnosticado artritis. El anticuerpo puede administrarse localmente a la articulación afectada.

[00292] Se observa neogenia linfoide ectópica en varias afecciones, que incluyen artritis psoriásica (Canete et al., Ann Rheum Dis, Jan 12, 2007, doi:10:1136/ard.2006.062042), enfermedades inflamatorias crónicas, in general (Aloisi & Pujol-Borrell, Nat Rev Imm 6:205-217, 2006) y en injertos que experimentan rechazo, tanto crónicos (Baddoura et al., Am J Trans 5:510-516, 2005) como agudos (DiCarlo et al., Am J Trans 7:201-210, 2007). CXCL13 y CXCR5 estaban presentes en injertos cardiacos (DiCarlo et al., *supra*); y CXCL13 estaba presente en artritis psoriásica (Canete et al., *supra*). La

presencia de CXCL13 y/o CXCR5 está asociada con el desarrollo de los folículos linfoides ectópicos con áreas de células B y de células T, como las que se encuentran en ganglios normales. También se asoció la presentación de aloantígenos por células B con el modelo de aloinjerto cardiaco agudo (Noorchashm et al., J Imm 177:7715-7722, 2006).

[00293] De esta manera, un anticuerpo de interés puede utilizarse para impedir la inflamación y el rechazo de injertos. Al paciente entonces se le administra una cantidad inhibidora de la actividad de las células B de un anticuerpo para reducir la inflamación, para minimizar el desarrollo de centros germinales ectópicos, para minimizar el reclutamiento de células B en un injerto y para minimizar la presentación de aloantígenos por células B antes o después de un procedimiento de trasplante.

[00294] La invención ahora se ejemplificará para ayuda del experto por medio de los siguientes ejemplos no limitantes que representan algunas de las realizaciones por medio de y en las cuales puede ponerse en práctica la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE INMUNÓGENO

[00295] Pueden inducirse anticuerpos monoclonales anti-CXCR5 en células CHO transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y expresarse en la superficie celular ("células r-CXCR5-CHO"). La secuencia de CXCR5 usada para transformar las células puede obtenerse a partir de bases de datos, tales como NM 001716.2, NC000011.8 o NM001716, y sintetizarse o aislarse a partir de una fuente celular adecuada.

[00296] El marco de lectura abierta de CXCR5 se coloca en un vector de expresión, tal como pCDNA3.1neo_DEST, y después este vector se introdujo por transfección en células 300-19 (Immunogen).

[00297] Además, el dominio EC de CXCR5, con la secuencia de aminoácidos MNYPTLEMDLENLEDLFWELDRLDNYNTSLVENHLC (SEC ID N°:1), se conjugó con KLH por la cisteína C terminal, y se utiliza como inmunógeno. Se administraron IP células que expresaban CXCR5 o el dominio EC de CXCR5 (5×10^6 células en 0,2 ml o 50 µg de péptido en 100 µl de amortiguador, opcionalmente mezclado con 100 µl de adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund). Las inyecciones con el antígeno se repiten cada dos semanas hasta que se detecta un alto título de anticuerpo para CXCR5 en el suero, por ejemplo, por FACS utilizando, por ejemplo, células $CXCR5^+$ y, por ejemplo, el MAB190 disponible en el mercado (R & D Systems) como control positivo.

[00298] Las células que expresaban CXCR5 se mantienen a 37°C en una

atmósfera con 5% de CO_2 en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) dializado al 10% (Invitrogen). Las células se preparan para la inyección sustituyendo el medio de cultivo anterior por solución salina (sin Ca/Mg) amortiguada con fosfato (CMF-PBS) suplementada con EDTA 5 mM, y recogiendo las células en ese amortiguador. Las células recogidas se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante aproximadamente 5 minutos, se lavan una vez por resuspensión del sedimento en CMF-PBS y centrifugación como se ha indicado anteriormente, se cuentan y se ajustan al volumen apropiado (tal como 5 x 10^6 células en 0,2 ml) para inyección por resuspensión del sedimento celular en CMF-PBS.

[00299] Como se ha mencionado, la expresión de CXCR5 se controló, por ejemplo, por análisis FACS, utilizando anticuerpos para CXCR5 disponibles en el mercado tales como MAB190 (R & D), clon RF8B2 y 2G8 (2G8 es un anticuerpo de rata anti-CXCR5 de ratón, mientras que los otros anticuerpos adquiridos son anticuerpos anti-CXCR5 humano) (BD), y 2C1 (Abnova), así como diversos anticuerpos policlonales dirigidos a hCXCR5 obtenidos poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica.

[00300] Para facilitar la construcción del plásmido y potenciar la expresión de CXCR5, se generan oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del péptido líder que comprendían los primeros 135 pares de bases de la secuencia de ácido nucleico codificante de CXCR5. Los oligonucleótidos contenían algunos cambios en las posiciones codificantes fluctuantes para reducir el contenido de GC. Todos los cambios en la secuencia nucleótidos fueron silenciosos, es decir, no se obtuvieron cambios en la secuencia de aminoácidos. Después de hibridar los oligonucleótidos entre sí, la secuencia codificante del péptido líder obtenido por ingeniería genética se une al resto de la secuencia codificante por PCR-SOE (Ho et al., Gene 77:51 (1989); y Horton et al., BioTechniques 8:528 (1990)).

[00301] La expresión de CXCR5 se verificó antes del uso como inmunógeno. Las células se cultivan en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene FBS al 10%, glutamina 0,2 mM y solución de aminoácidos no esenciales 1x y después se siembran aproximadamente 3-5 x 10^5 células por pozo en un matraz T75 y se cultivan durante aproximadamente 24-48 horas.

[00302] Las células transformadas o transfectadas se cultivan durante aproximadamente dos semanas hasta que las células que no llevaban el plásmido de expresión de CXCR5 se eliminaron por selección con antibiótico. Las células de las líneas estables pueden lisarse y pueden obtenerse proteínas y someterse a análisis de transferencia Western.

[00303] Las células transfectadas estables o transitorias se ensayan con

respecto a la expresión de CXCR5 utilizando métodos para detectar la expresión de CXCR5 en la superficie celular, tales como análisis FACS. Como alternativa, las células pueden lisarse y las proteínas estudiarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Las células transfectadas recogidas de las placas de cultivo se lavan una vez con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se resuspenden en agua desionizada, se mezclan con un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x (BioRad, Hercules, CA) y después se calientan a aproximadamente 100°C durante 10 minutos. La proteína de la membrana se analiza utilizando medio acondicionado mezclado con un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x y calentado a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se separan utilizando SDS-PAGE en un gradiente de 4-12%. Las proteínas se transfirieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA), que se bloquea con leche en polvo sin grasa al 5% en PBST (PBS con 0,05% de TWEEN-20®) durante por lo menos una hora antes de transferir la proteína.

[00304] CXCR5 se detecta incubando la membrana con anticuerpo primario específico para CXCR5 en amortiguador de bloqueo durante por lo menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lava por lo menos tres veces y se añade anticuerpo secundario conjugado con indicador en amortiguador de bloqueo y se incuba durante por lo menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lava tres veces en PBST y se revela con, por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE mABS ANTI-CXCR5

[00305] Se inmunizan ratones A/J o BALB/cJ, de aproximadamente 4-6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con las células transfectadas con CXCR5- o un péptido de EC. Un grupo de ratones se ceban por vía intraperitoneal el día 0 con una emulsión 1:1 de péptido conjugado con KLH mezclado con adyuvante (CFA), se refuerzan por vía ip el día 20 con los péptidos con IFC (adyuvante incompleto de Freund) y/o células en PBS sin adyuvante, y finalmente se refuerzan por vía intravenosa el día 44 con los péptidos-KLH mezclados en IFC y/o las células en PBS, sin adyuvante. Otro grupo de ratones se ceban por vía ip el día 0, se refuerzan por vía ip los días 15, 39, 53 y 67, y finalmente se refuerzan por vía intravenosa el día 81 (todas las inyecciones con células en PBS, sin adyuvante). En los dos grupos de ratones, cada inyección contenía aproximadamente de 3 $x10^6$ a 2 x 10^7 células en un volumen de aproximadamente 200 µl. Como alternativa, se realizan inmunizaciones con péptido y/o células una vez cada dos semanas, 3-6 veces hasta que se obtiene un título deseable de anticuerpo anti-CXCR5, determinado, por ejemplo, por análisis FACS o ELISA.

[00306] Tres días después de la última inyección, los ratones, opcionalmente, se ensayan con respecto al título de anticuerpo anti-CXCR5 en suero, se sacrifican y los bazos se extraen y se colocan en aproximadamente 10 ml de DMEM sin suero (Gibco) en una placa Petri. Los esplenocitos se separan de la cápsula utilizando pinzas y se lavan dos veces en 10 ml de IMDM sin suero (Cellgro, Herndon, VA) a 37°C. Las suspensiones de células de bazo se transfirieren a un tubo de fondo cónico de 15 ml y se dejó que los desechos sedimentaran durante aproximadamente 2-5 minutos. El sobrenadante que contenía los esplenocitos se transfiere a un tubo de fondo cónico de 15 ml y se lava tres veces más con IMDM hasta la fusión. Las células de bazo de ratones pueden juntarse.

[00307] Opcionalmente, se preparó una suspensión de células individuales de 5 ml de células de alimentación de bazo de control a partir de un ratón inmunizado esencialmente como se ha descrito anteriormente para las células de bazo inmunizadas y se coloca en un incubador (37°C, 5% de CO_2) hasta que se necesita.

[00308] El compañero de fusión para las células de bazo inmunizadas puede ser una línea de células de mieloma no secretora, sensible a hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT), tal como P3X63-AG8.653 o SP2/0 (ATCC, Manassas, VA) o linfoblastos FO_B (ATCC, CRL-1646)). Antes de las fusiones, las células linfoides se mantienen en IMDM/FBS al 10% (37°C, 7% de CO_2) asegurando que las células están en fase de crecimiento logarítmica el día de la fusión. Un mecanismo de selección alternativo se basa en el uso de azaserina, que típicamente se añade un día después de la fusión.

[00309] El protocolo de fusión utilizado es un híbrido de los protocolos indicados en Lerner (Yale J Biol Med, 1981, 54(5)387-402) y Gefter et al. (Somatic Cell Genet, 1977, 3(2)231-236). Antes de la fusión, las células de bazo reunidas se lavan tres veces con IMDM sin suero, y se cuentan. Además, inmediatamente antes de la fusión, las células de mieloma en fase logarítmica se lavan tres veces con IMDM sin suero y se cuentan. Las células linfoides se resuspenden en a 1 x 10^7 células/ml en IMDM sin suero. Para cada fusión, se mezclan 1-1,5 x 10^8 células de bazo con 1-3 x 10^7 células de mieloma en un tubo de polipropileno de fondo cónico de 50 ml, y las células se lavan una vez con IMDM sin suero. La relación entre células de bazo y células de mieloma fue 5:1. Los tubos se centrifugan a 500 x g durante 10 minutos para sedimentar las células. Después de aspirar los sobrenadantes, los sedimentos se resuspenden suavemente dando unos ligeros golpes en el fondo de los tubos. Después se colocan los tubos en un vaso de precipitados de agua a 37°C. Todas las etapas de fusión posteriores se realizan en ese vaso de precipitados.

[00310] A continuación, se añade lentamente 1 ml de polietilenglicol 1500

(Roche Applied Science, Indianapolis, IN) precalentado a 37°C a cada sedimento de células durante el transcurso de aproximadamente 1 minuto, mientras se agita suavemente el tubo. Las células se incuban en el PEG durante aproximadamente un minuto seguido de la adición de un ml de IMDM sin suero gota a gota a cada sedimento durante el transcurso de 30 segundos, y después se añaden 9 ml de IMDM sin suero a cada sedimento durante el siguiente minuto. Los dos tubos se centrifugan a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y los sobrenadantes se aspiran. El sedimento de células se resuspende en 100 ml de medio de producción de hibridoma completo filtrado (500 ml de IMDM (Cellgro) mezclado con FBS al 10% (SeraCare, Millford, MA), L-glutamina 0,2 mM, solución de aminoácidos no esenciales 1x, piruvato sódico 1 mM, pen-estrep al 0,01% (Invitrogen) y 1X suplemento HT (Invitrogen)).

[00311] Cada 100 ml de suspensión celular se colocan en diez placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos, con un volumen de ~100 µl/pozo. Las placas se mantienen en un incubador a 37°C, 7% de CO_2. El día 2 después de la fusión, las células se seleccionan por la adición de azaserina 5,7 µM en IMDM a las células fusionadas a 100 µl por pozo. Se retiran sobrenadantes para la selección primaria, típicamente los días 10-14 después de la fusión, de los pozos que contenía clones. La eficacia de la fusión fue de 75-99% (720-950 de 960 pozos posibles desarrollaron clones que se someten a selección).

[00312] La selección primaria puede ser un radioinmunoensayo (RIA) diseñado para detectar anticuerpos que se unen al CXCR5 humano. Para realizar el RIA, se añade IgG de cabra anti-ratón purificada por afinidad (específica para el fragmento F_c) (Cappell, Cochranville, PA) en PBS a placas de microtitulación de PVC de 96 pozos (50 µl/pozo) y se incuban durante una noche a 4°C. La IgG de cabra anti-ratón se retira de las placas y los pozos se bloquean con 100 µl/pozo de FCS/PBS al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de bloqueo, se añade sobrenadante de cultivo de hibridoma puro a los pozos (50 µl/pozo) y la mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. A continuación, se añaden 50 µl de ^{125}I-CXCR5 (~20,000 cpm) en PBS/FCS al 5% a cada pozo y la mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, los pozos se lavan 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. Después de retirar todo el amortiguador de lavado, los pozos se separan cortando las placas y se analizan en un contador gamma. Los pozos a los que se añade FCS/PBS al 5% en lugar de sobrenadante de cultivo sirven como pozos de fondo.

[00313] El CXCR5 purificado se marca con ^{125}I de acuerdo con el método de Bolton-Hunter, sustancialmente como se describe por el proveedor del reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA). La calidad del ^{125}I-CXCR5 se controla

confirmando que el procedimiento de marcaje no destruía los epítopos reconocidos por los anticuerpos para CXCR5 disponibles en el mercado (R & D o Becton Dickinson, Mountain View, CA).

[00314] Los clones se consideran positivos tras la selección primaria si muestras del sobrenadante se marcan aproximadamente 10 veces con respecto al nivel de fondo en el RIA. Los clones positivos se sacan, se expanden y se almacenan en estado congelado.

[00315] Se diseña una selección de hibridoma primaria para determinar si los anticuerpos reconocían epítopos nativos de CXCR5. Esto se consigue por medio de un análisis FACS de CXCR5 de la superficie celular presentado en células $CXCR5^+$ teñidas con los anticuerpos monoclonales, y la visualización de la unión con segundo anticuerpo de cabra anti-ratón marcado en forma fluorescente. Los clones se consideran positivos tras la selección primaria si muestras del sobrenadante se marcan aproximadamente 10 veces con respecto al nivel de fondo en el análisis FACS. Además, para localizar los epítopos de CXCR5 unidos a los anticuerpos, se realizan ensayos competitivos con anticuerpos para CXCR5. Se seleccionan clones positivos, se expanden y se almacenan en estado congelado.

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

[00316] Se usó un ensayo de unión basado en células para caracterizar los mAb anti-CXCR5. Por ejemplo, pueden utilizarse las células transfectadas que expresan CXCR5 descritas anteriormente, tales como hCXCR5/Hek293. Se clonó en un vector un marco de lectura abierta de CXCR5 humano de longitud completa, por ejemplo, en pCDNA3.1neo DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). La región codificante de CXCR5 se sintetiza por RT-PCR utilizando ARN de hígado y de cerebro humano (Ambion, Inc., Austin, TX) como plantilla. La construcción plasmídica final, CXCR5/CDNA3.1neo, expresó una proteína CXCR5 de longitud completa. Se generó una estirpe celular estable que expresaba CXCR5 por transfección de la construcción plasmídica CXCR5/pCDNA3.1neo en células CHO o Hek293 (N° ATCC CRL-1573) utilizando un kit Lipofectamine 2000 convencional y disponible en el mercado. Después de la transfección, las células se cultivan en DMEM durante una noche, después se vuelven a sembrar en medio con 200 µg/ml de neomicina y se cultivan durante 12-14 días. se recogen colonias individuales aisladas y se cultivan en pozos separados hasta que se amplifican suficientes células para clonación. Se identifican clones estables resistentes a neomicina y que expresaban altos niveles de proteína CXCR5 por análisis FACS utilizando anticuerpos policlonales anti-CXCR5 (R&D Systems,

Minneapolis, MN) o anticuerpos policlonales generados a medida.

[00317] También se confirma la expresión de CXCR5 en células HS Sultan humanas (N° ATCC CRL-1484) que expresan CXCR5 de manera natural, por análisis FACS. Se cultivan células HS Sultan en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, glutamina 0,2 mM y solución de pen/estrep al 0,1% (100 µg/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina).

[00318] La unión de anticuerpo basada en células puede evaluarse utilizando el sistema de detección de células FMAT™ (selección de alto rendimiento macroconfocal con fluorescencia) 8100 HTS o 8200 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se siembran estirpes celulares que expresan CXCR5 de manera natural o transfectadas de manera estable con construcciones de expresión de CXCR5 en placas de 96 pozos. Como alternativa, se siembran células 293T o CHO transfectadas de manera transitoria en la placa de 96 pozos. Las células se siembran a una densidad de 5.000-30.000 células por pozo. Después de 20-24 horas, se añaden mAb anti-CXCR5 y anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con FMAT conjuntamente a los pozos y se incuba durante 1 h, 2 h, 4 h o durante una noche a temperatura ambiente.

[00319] La unión de anticuerpo basada en células también se evalúa por FACS utilizando una estirpe celular estable Hek293/CXCR5 que expresaba CXCR5. Las células se incuban con mAb anti-CXCR5 en PBS. Después de tres lavados, las células se incuban con anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente (BD Sciences, Palo Alto, CA).

[00320] Los resultados indicaron que varios mAb se unen al CXCR5 expresado en construcciones de plásmido recombinante. Por ejemplo, se ensayan 11D6, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6, 79B7 y 16D7, variantes humanizadas del último anticuerpo, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC1-LC1 y 16D7-HC2-LC1, un anticuerpo de IL13 de control negativo, CA13, controles positivos, MAB190, 2C1 y RF8B2, tres controles de isotipo de ratón para IgG1, IgG2a e IgG2b y un control de isotipo de IgG2b de rata (correspondiente a RF8B2), con respecto a la unión a las células HEK transfectadas para expresar CXCR5. Los anticuerpos de control positivo 2C1 y MAB190 se unieron a las células CXCR5. RF8B2 presentó niveles de unión intermedios. Los anticuerpos de control negativo presentaron sólo unión de fondo. Todos los anticuerpos excepto CA13 se unieron a las células hCXCR5/HEK con perfiles de unión y cinéticas de titulación similares a las del anticuerpo progenitor 16D7 y a las de 79B7.

[00321] También se tiñen células 2993 transfectadas con reactivos de inmunofluorescencia de manera transitoria que contenían un plásmido CXCR5/neo como se

ha descrito anteriormente y se observan por microscopía de fluorescencia. Los análisis FACS y FMAT basados en células confirman que los mAb efectivamente se unen al CXCR5 expresado en construcciones plasmídicas recombinantes o como proteína natural en células cultivadas. Se determina una señal de unión positiva basándose en la lectura de señal FMAT que es significativamente mayor que la unión de fondo y otros clones de hibridoma negativos ($p > 0,01$).

[00322] Los mAb para CXCR5 generados, tales como 16D7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6 y 79B7, se unen al dominio EC y bloquean la unión de CXCL13 al CXCR5 en la célula.

EJEMPLO 4: ANÁLISIS DE AFINIDAD BIACORE

[00323] Se sintetiza la región EC N-terminal de CXCR5 (aminoácidos 1-59) de humano y de ratón con un marcador de biotina terminal. Los péptidos sintéticos se inmovilizan en un chip Biacore durante aproximadamente 20 unidades de respuesta (RU). Después, los mAb se exponen al chip para recoger las mediciones cinéticas y para el mapeo del epítopo, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[00324] El clon de mAb de ratón anti-hCXCR5 16D7, tenía un valor calculado de kD de $2,16^{-12}$ M; el anticuerpo quimérico de IgG4 de ratón/humana 16D7 (regiones VH y VL de 16D7 injertadas en una Fc de IgG4 humana, opcionalmente con codones optimizados, utilizando métodos convencionales tales como clonación, amplificación de extremos, determinación de la masa de las regiones y clonación de las partes) tenía una kD de $1,41^{-12}$ M; y para las diversas variantes humanizadas de 16D7, donde la estructura de las variantes y la derivación de sus cadenas pesadas y ligeras se denota por los términos, "HC_" para una cadena pesada particular y "LC_" para una cadena ligera particular, donde la composición de las cadenas se proporciona más adelante aquí, 16D7-HC1-LC1 tenía una kD de $3,11^{-12}$ M; 16D7-HC1-LC2 tenía una kD de $1,41^{-12}$ M; 16D7-HC2-LC1 tenía una kD de $2,40^{-12}$ M; 16D7-HC1-LC3 tenía una kD de $1,21^{-12}$ M; 16D7-HC3-LC4 tenía una kD de $4,92^{-12}$ M; 16D7-HC3-LC5 tenía una kD de $1,84^{10}$ M; y 16D7-HC1-LC6 tenía una kD de $9,17^{-11}$ M.

[00325] SAR113244 humanizado, una forma de la variante 16D7 humanizada, 16D7-HCL-LC3 que lleva la suscripciones S241P y L248E (métodos y reactivos conocidos que practican sustituciones introducidas, utilizando numeración Kabat), se captura en un chip Biacore mediante anticuerpo IgG Fc antihumano de ratón pre-inmovilizado, y luego utilizado en un ensayo Biacore de formato de ensayo inverso en donde las cinéticas de la interacción de péptido de Terminal N CXCR5 humano no marcado

(aminoácidos 1-59) con el mAB sobre el chip se determinan. Se determina Kb el para el SAR113244 que es de 1.13±0.08-11M. Se determinan los valores Kb como el ensayo delantero utilizando péptido humano biotinilado inmovilizado en la superficie del chip y SAR113244 como analito, que fueron consistentes con aquellos obtenidos utilizando el ensayo inverso

EJEMPLO 5: ANÁLISIS DE transferencia Western DE LA ACTIVIDAD DE UNIÓN DE MAB ANTI-CXCR5

[00326] Se realiza transferencia Western para evaluar la actividad de unión de mAb anti-CXCR5 al CXCR5 en condiciones de desnaturalización, así como los niveles de expresión de CXCR5 y otras proteínas relacionadas con CXCR5 en estirpes celulares humanas. También se preparan muestras de proteína a partir de células transfectadas de manera estable utilizando el equipo de reactivo de extracción de proteínas de mamífero M-PER (Pierce, Rockland, IL, N° Cat 78501) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se calientan a 70°C durante 10 minutos después de añadir un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x. Todas las muestras se separan por electroforesis en un gel de SDS-PAGE con un gradiente de 4-12%. Las proteínas se transfirieren desde el gel a una membrana de PVDF y se aplican mAb anti-CXCR5 a la membrana de transferencia Western como anticuerpo de detección primario. Para la detección se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 680 y las membranas se exploran utilizando el sistema de formación de imágenes por infrarrojos Odyssey (Li-cor, Lincoln, Nebraska) o utilizando electroquimioluminiscencia (ECL). Se generan anticuerpos de control positivo contra CXCR5 humano como se enseña aquí.

EJEMPLO 6: ENSAYO FACS PARA EL CONTROL INTERNALIZACIÓN DE CXCR5

[00327] Se obtienen células de la capa leucocitaria (buffy coat) a partir de voluntarios sanos (Gulf Coast Blood Center, Houston, TX). Se aíslan células mononucleares periféricas (PBMC) humanas con un método de gradiente de Ficoll-Hypaque convencional. Las PBMC se cultivan (0,5 x 10^6 células/pozo) en una placa de 96 pozos a 4°C. Cada pozo contiene 0,2 ml de RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales (10 µg/ml). Después de 30 minutos, el medio se reemplaza por RPMI 1640 nuevo frío suplementado con FBS al 10% y sin anticuerpos. Las células se transfieren a una cámara de cultivo de tejidos humidificada a 37°C que contiene 5% de CO_2. Las células tratadas con anticuerpo monoclonal se recogen inmediatamente, 2 h o 24 h

después de transferir las células a 37°C. Las células se lavan una vez con PBS y se incuban en PBS frío que contiene BSA al 1% (PBSB) durante 30 minutos. Las células después se tiñen con anticuerpo anti-CXCR5 humano conjugado con PE (BD Biosciences). Después de 30 minutos, las células se lavan 3 veces con PBSB y se fijan en solución de paraformaldehído al 1% durante una noche. Al día siguiente, se analiza la presencia de CXCR5 con un citómetro de flujo del sistema BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

EJEMPLO 7: ENSAYO FLIPR

[00328] Se miden cambios en el calcio intracelular cultivando 9000 células/pozo e incubando durante una noche. Las células eran de la estirpe RBL-2H3 transfectada de manera estable con CXCR5 humano. Las células después se lavan y se cargan con fluo-4/AM 2 mM (Molecular Probes) en un amortiguador que contenía probenecid 2,5 mM. Las células se exponen a mAb para CXCR5 y después se lavan con amortiguador de ensayo. Las células se exponen a CXCL13 10 nM (R & D). Los cambios en el Ca^{+2} intracelular se registran utilizando el dispositivo 384-B FLIPR (Molecular Devices). Como controles se utilizan mAb anti-CXCR5 humanos disponibles en el mercado, e IgG1 e IgG2b de ratón.

[00329] Como se analiza más adelante aquí, se construyeron varias versiones humanizadas de mAb 16D7, tales como CHIMERIC 16D7 (la quimera de $hIgG_4$), 16D7-HC1-LC1, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC2-LC1, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC3-LC4, 16D7-HC3-LC5 y 16D7-HC1-LC6, y se ensayan con respecto a la actividad biológica como se demuestra por el flujo de calcio.

[00330] Los anticuerpos humanizados, aparte de un control negativo, CA13, demostraron una actividad neutralizadora de señales igual a la del anticuerpo 16D7 progenitor sobre células transfectadas que expresaban de manera estable CXCR5.

EJEMPLO 8: ENSAYO DE QUIMIOTAXIS

[00331] Se añaden células HS Sultan $CXCR5^+$ (ATCC CRL1484) a la cámara superior de una placa transwell (Millipore) a 0,5 x 10^6 células/pozo en la presencia de CXCL13 100 nM (R & D) o amortiguador CTX (RPMI sin rojo de fenol, que contiene FBS al 1%, BSA al 0,5% y piruvato Na 1 nM) y se evalúa el número de células que migraban a la cámara inferior. Las dos cámaras se ensamblaron y se incuban durante dos horas. Se cuentan las células de la cámara inferior después de añadir reactivo colorimétrico

(Promega) y de leer a DO_{490}.

[00332] La migración específica de CXCR5 se determina como la diferencia entre el número total de células que habían migrado y el número de células que migraban de manera espontánea. Si se ensaya un anticuerpo anti-CXCR5, las células se incuban con el anticuerpo durante 30 minutos antes de la adición a la cámara superior. El grado de inhibición de anticuerpo es la relación de la migración específica en presencia de anticuerpo con respecto a la cantidad de migración en ausencia de anticuerpo. La relación puede multiplicarse por 100% para producir un porcentaje de inhibición.

[00333] Los anticuerpos del Ejemplo 7 se comparan con el anticuerpo 16D7 progenitor con respecto a la capacidad de neutralizar la quimiotaxis. Todos los anticuerpos humanizados aparte del mAb de control negativo CA13, neutralizaron la quimiotaxis en un perfil comparable al de 16D7 y 79B7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6. R&D MAB190 tenía una actividad intermedia mientras que H28 y el anticuerpo de Abnova 2C1 no neutralizaban completamente la migración de las células inducida por el ligando.

EJEMPLO 9: CÉLULAS B HUMANAS PRIMARIAS ENSAYO DE REACTIVIDAD

[00334] Se aíslan PBMC humanas a partir de sangre entera utilizando columnas Accuspin (Sigma). Después se resuspenden PBMC en amortiguador de teñido BD (Becton Dickinson) a 20 millones de células/ml. Se añade un µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR5 humano a 50 µl de PBMC y se permite la unión durante 20 minutos a 4° C. Las células se lavan dos veces con amortiguador BD Stain. Se añaden cincuenta µl del segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE $F_{(ab')}$ (Beckman Coulter) diluido 1/100, al cóctel de PBMC-anticuerpo y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan tres veces con amortiguador BD Stain. A las células se les añade una mezcla que contenía anticuerpo de ratón anti-CD20 humano-FITC (BD) y CD4-APC (BD) a una dilución 1/50, y éstas después se incuban durante 20 minutos a 4°C para evaluar la especificidad por las células B/T. Las células se lavan 3 veces con amortiguador BD Stain, se resuspenden en 250 µl de amortiguador BD Stain y se someten a un análisis FACS en un FACStar Plus. Como control positivo se utiliza anticuerpo de ratón anti-CXCR5 humano (R&D; mAb190). Se generan curvas de titulación para anticuerpos humanizados y se representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) frente a la concentración.

[00335] Los anticuerpos humanizados del ejemplo 7 se ensayan con respecto a la unión a PBMC humanas.

[00336] Los anticuerpos, aparte del control negativo CA13, se unen y tienen

el mismo perfil de titulación sobre células B humanas. El CA13 de control negativo, sólo demuestra una unión de fondo. El clon RF8B2 de BD se une débilmente a PBMC humanas.

EJEMPLO 10: CÉLULAS B DE MACACO

ENSAYO DE REACTIVIDAD

[00337] Se obtiene sangre entera de macaco (cyno) en Bioreclamation, Inc. (Hicksville, NY). La sangre se transporta en tubos de preparación de células (CPT) de BD después de la centrifugación. Las PBMC de cyno contenidas en la capa plasmática se retiran del tubo CPT y se introducen en un tubo de 50 ml que tenía la capa de gel en gradiente sin alterar. El tubo se lava con 5 ml de PBS para extraer completamente todas las células y el lavado se añade a un tubo limpio de 50 ml. Las PBMC de cyno se centrifugan a 1200 RPM durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en 1 ml de amortiguador BD FACS Stain (BD). Se utilizan un millón de células por ensayo. Se añade un µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR5 humano (purificado) a 50 µl de PBMC y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan dos veces con amortiguador BD Stain. Se añaden cincuenta µl de segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE $F_{(ab')}$ (Beckman Coulter) diluido 1/100 a las células y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan tres veces con amortiguador BD Stain. A las células se les añade una mezcla que contiene anticuerpo de ratón anti-CD20 humano-FITC (BD) y CD4-APC (BD) a una dilución 1/20 durante una incubación de 20 minutos a 4°C para evaluar la especificidad por las células B/T. Las células se lavan 3 veces con amortiguador BD Stain, se resuspenden en 250 µl de amortiguador BD Stain y se someten a un análisis FACS en un FACStarPlus. Como control positivo se utiliza el mAb de ratón anti-CXCR5 humano comercial (R&D; MAB190).

[00338] El anticuerpo monoclonal 11D6 de la presente invención reactivo con CXCR5 humano, se compara con un control de isotipo de IgG, las versiones humanizadas de 16D7 y el MAB190 se ensayan con respecto a la reactividad con CXCR5 cynomolgus. También se ensayó 79B7.

[00339] Se encontraron células positivas para CD20 y CXCR5 con MAB190 y 11D6. Por otra parte, 16D7 y sus variantes humanizadas, así como G7 y RF8B2 de BD y 2C1 de Abnova no se unen a células B de macaco. 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 también se unieron a células B de cynomolgus.

[00340] Los presentes anticuerpos CXRC5 se utilizan para estudiar células sanguíneas periféricas. Las células B expresan CXCR5 en por lo menos un experimento, aproximadamente el 10% de las células T periféricas se encuentran que expresan el

CXCR%.

EJEMPLO 11: SECUENCIACIÓN DE mAb ANTI-CXCR5

[00341] Los anticuerpos monoclonales de ratón se isotipifican utilizando un kit de isotipificación disponible en el mercado. Se secuencian las secuencias variables de 16D7 y otros mAb anti-CXCR5. Se aísla el ARN total de aproximadamente 5 millones de células del hibridoma utilizando el equipo Qiagen Qianeasy miniprep siguiendo el protocolo del equipo. Se sintetiza ADNc de la primera cadena utilizando el equipo Superscript de Invitrogen (Cat 11904-018), siguiendo los protocolos del equipo.

[00342] Primero se amplifican las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera utilizando los siguientes cebadores de PCR degenerados y la Taq polimerasa (Roche) basándose en métodos descritos en Wang et al. J Immunol Methods. 233:167-77, 2000.

[00343] Cadena Pesada: Cebador izquierdo:

1: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEC ID N°:2)

2: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEC ID N°:3)

[00344] Cadena Pesada: Cebador derecho:

GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEC ID N°:4)

[00345] Cadena Ligera: Cebador izquierdo:

GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEC ID N°:5)

[00346] Cadena Ligera: Cebador derecho:

TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEC ID N°:6)

[00347] donde R es A o G; N es A, G, T o C; M es A o C; W es A o T; S es G o C; e Y es C o T.

[00348] Los productos de PCR se clonaron en pCR4-TOPO® utilizando el equipo de clonación TOPO TA cloning® (Cat n°: 45-0641) y se secuencian utilizando los cebadores de T3 y T7. Después, las secuencias se comparan por medio del programa Blast frente a la base de datos del banco de genes para deducir las secuencias líder para la clonación de regiones variables completas. Basándose en los resultados del Blast, se eligen los siguientes cebadores (Chardes et al., FEBS Letters 452:386-394, 1999) para una segunda vuelta de amplificación por PCR utilizando la Pfx polimerasa (Invitrogen).

[00349] Cadena Pesada:

[00350] Cebador izquierdo:

CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEC ID N°:7)

[00351] Cebador derecho:

CGACAAGTCGACTAGCCCTTGACCAGGCATCC (SEC ID N°:8)

[00352] Cadena Ligera:

[00353] Cebador izquierdo:

WTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEC ID N°:9)

[00354] Cebador derecho:

CGACTAGTCGACTGGTGGGAAGATGGATACAG (SEC ID N°:10)

[00355] Los productos de PCR se clonaron en pCR-Blunt II®-TOPO® utilizando el equipo de clonación por PCR Zero Blunt® TOPO® de Invitrogen (Cat 45-0245) y se secuencian utilizando cebadores de T7.

[00356] Una vez secuenciadas las cadenas ligeras y pesadas, los ácidos nucleicos pueden registrarse para optimizar la expresión, por ejemplo, en células anfitrionas humanas.

EJEMPLO 12: TRANSFECTOMAS

[00357] Se cultivan células NS0-eu a una densidad de 1 x 10^6 células/ml. Las células se mantienen en fase de crecimiento exponencial y el medio se cambia el día previo a la transfección. El día de la transfección, se lavan 40 x 10^6 células. Después, se añaden 10 µg de ácido nucleico linealizado, tal como ADN de cadena ligera, y 10 µg de, por ejemplo, ADN de cadena pesada linealizado a la suspensión celular (el volumen de ADN total debe ser menor de 50 µl) y el cultivo se incuba en hielo durante 15 min. La mezcla de ADN y células se transfiere a una cubeta enfriada (0,4 cm) y se aplica un pulso eléctrico (750 V y 25 µF). La cubeta se pone en hielo inmediatamente después del pulso eléctrico y se mantiene en hielo durante 10-15 min. Las células se recogen y se cultivan en placas. Las células se incuban en un incubador con 5% de CO_2 durante 12-16 días o hasta que aparecen colonias. El sobrenadante de las colonias de células o de las células cultivadas en cultivo en suspensión se ensaya por ELISA los transfectomas positivos se clonan en medio limpio. para seleccionar adicionalmente los transfectomas positivos, se realiza titulación ELISA o el ensayo Biacore. Los transfectomas expandidos se mantienen en matraces de agitación y se recoge anticuerpo o su derivado del sobrenadante.

EJEMPLO 13: ENSAYOS *IN VIVO*

[00358] Se ha utilizado la artritis inducida por colágeno (CIA), un modelo bien establecido para RA humana, para demostrar la eficacia de anticuerpos contra TNFα (Williams et al., PNAS 1992, 89:9784-9788), así como proteínas de fusión de CTLA-4 y

TNFα (Webb et al., Eur J Immunol. 1996, 26:2320-2328; y Wooley et al., J Immunol. 1993, 151:6602-6607). Se perfiló un anticuerpo monoclonal de rata anti-CXCR5 de ratón, clon 1038, en un modelo de ratón de CIA en el que ratones DBA/1J se inmunizan y se refuerzan con colágeno de pollo de tipo II. La gravedad de la enfermedad (que se evaluaba visualmente midiendo la hinchazón/inflamación de la pata) se controló dos veces por semana, mientras que en las articulaciones recogidas al final del estudio se evaluaron los cambios en la inflamación, pannus, destrucción del cartílago y erosión ósea. El clon 1038, cuando se administraba en un régimen de dosificación profiláctico, reducía significativamente tanto la gravedad de la enfermedad como la patología de la articulación en comparación con ratones CIA tratados con isotipo (ANOVA de medición repetida, $p<0,05$).

[00359] Se empleó un modelo agudo de ratón para evaluar la eficacia de 16D7-HC1-LC3 en la quimiotaxis *in vivo*. En resumen, se generan ratones C57/Bl6 (8-16 semanas de edad) que expresaban selectivamente huCXCR5 en inmunocitos, tales como células B, células T y neutrófilos, por métodos transgénicos tradicionales utilizando un promotor de CD11a. El modelo de quimiotaxis *in vivo* es un modelo dirigido por neutrófilos. Tras la administración intraperitoneal de 20 μg de ligando huCXCL13 (R&D), los neutrófilos de ratón que expresaban el receptor huCXCR5 migraron a la cavidad peritoneal en respuesta a un gradiente de huCXCL13. Se utilizan lavados de la cavidad peritoneal para recuperar células 80 minutos después de la administración intraperitoneal de huCXCL13 y se utiliza un análisis fluorocitométrico para cuantificar el número de neutrófilos que expresaban huCXCR5 en muestras de 2 ml de lavados peritoneales que migraban específicamente a la cavidad peritoneal en respuesta a la instilación de huCXCL13. Los neutrófilos se identifican por marcadores fenotípicos, tales como Ly6G, CD19 y CD11b. La administración subcutánea de anti-hCXCR5 humanizado, 16D7-HC1LC3, a dos dosis diferentes (7,5 μg o 15 μg) 24 horas antes de la instilación de huCXCL13 mostró eficacia en la reducción de la migración de neutrófilos que expresaban huCXCR5 a la cavidad peritoneal en respuesta a huCXCL13 en comparación con un control tratado con isotipo, mostrando las dos muestras tratadas con anticuerpo de CXCR5 niveles de neutrófilos que esencialmente no son estadísticamente diferentes en comparación con el nivel de neutrófilos de control negativo de isotipo. A 1,5 μg, el anticuerpo para CXCR5 humanizado mostró un bajo nivel de inhibición de migración de neutrófilos en comparación con las dosis mayores de anticuerpo para CXCR5 ensayado.

EJEMPLO 14: RECUBRIMIENTO

[00360] La técnica de recubrimiento del clon 16D7 murino siguió las etapas

descritas en in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:969 y en la Patente de Estados Unidos 5.639.641.

[00361] Las secuencias de V_L y V_H de 16D7 se comparan por el programa Blast frente al Protein Data Bank (Nucleic Acids Research, 28:235-242 (2000) o se puede acceder al Protein Data Bank (PDB) por internet, que contiene las coordenadas 3D de macromoléculas biológicas, y se recuperaron las diez secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera más similares a la de 16D7. Para identificar las secuencias se usan los códigos de identificación PDB.

[00362] Los diez homólogos más parecidos para la cadena ligera variable fueron 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), 1AE6 (Proteins 29:161-171, 1997), 1QYG (Pozharski et al., "Carving a Binding Site: Structural Study of an Anti-Cocaine Antibody" en "Complex with Three Cocaine Analogs"), 1UZG (J Virol 79:1223, 2005), 1UB5 (Beuscher et al., "Structure and Dynamics of Blue Fluorescent Antibody 19G2 at Blue and Violet Fluorescent Temperatures"), 1RUR (Proc Natl Acad Sci USA 110:2247-2252, 2004, 1FPT (Nat Struct Biol 2:232-243, 1995), 1QFU (Nat Struct Biol 6:530-534, 1999), 1NAK (Virology 315:159-173 , 2003) y 1CGS (J Mol Biol 236:247-274, 1994) (se retiran las secuencias redundantes) y los diez homólogos más parecidos para la cadena pesada variable son 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000), 1OAK (Nat Struct Biol 5:189-194, 1998), 1VFB (Proc Natl Acad Sci 91:1089-1093, 1994), 1CIC Nature 348:254-257, 1990), 1GIG (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50:768-777, 1994), 1T4K (J Mol Biol 343:1269-1280, 2004), 1A7P (Marks et al.), 1FE8 (J Biol Chem 276:9985-9991, 2001), 1DL7 (J Exp Med 191:2101-2112, 2000) y 1YY8 (Cancer Cell 7:301-311, 2005). Los homólogos más parecidos para las cadenas ligera y pesada fueron 1MJU y 1FNS, respectivamente. Estas dos secuencias se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a minimización de energía por una minimización en gradiente de conjugado de posiciones de coordenadas atómicas con el campo de fuerzas CHARMM22 (J Comput Chem (1983) 4, 187; J Comput Chem (1986) 7, 591) como se aplica en la serie MOE (Chemical Computing Group, Quebec, CA). El modelo se utiliza para localizar las regiones CDR y los residuos de estructura. Se calculó la accesibilidad al disolvente para cada resto de región variable de los diez homólogos más parecidos para cada región variable de anticuerpo y se promedia en una hoja de cálculo Excel como se aplica en un protocolo Scitegic (Hill & Lewicki (2006) Statistics: Methods and Applications, Statsoft, Tulsa, OK). Las posiciones con más de 30% de accesibilidad media se consideran residuos de la superficie. También se consideran las posiciones con accesibilidades medias comprendidas entre 25% y 30% dependiendo de la proximidad a los bucles de CDR.

[00363] Las posiciones de superficie de la región variable del 16D7 murino se comparan con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpo humano. Sólo se conservan para la búsqueda los residuos que presentaron un área de superficie accesible mayor de 30%, con unos pocos residuos que presentaban un área de superficie accesible mayor de 25% y que eran residuos de estructura expuestos al disolvente. Se incluyeron algunos residuos conservados en todas las secuencias de inmunoglobulina para mejorar la convergencia de la búsqueda. Para el análisis de aciertos sólo se retienen secuencias de la línea germinal. Se eligió la superficie de región variable de anticuerpo humano con los residuos de superficie más parecidos, dando una consideración especial a posiciones que están a una distancia menor o igual a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar los residuos de superficie de región variable del anticuerpo de murino 16D7.

[00364] Ninguna de las secuencias contiene ningún epítopo conocido de células B o células T indicado en la base de datos Immune Epitope (IEDB, Immune Epitope Database and Analysis Resource web site; PLoS Biol. 2005;3(3):e91).

[00365] Las secuencias originales de los dominios variables de 16D7 murino son:

[00366] la cadena ligera (las CDR están subrayadas):

[00367] DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLLHSSGKTYLYWFL QRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:11); y

[00368] la cadena pesada (las CDR están subrayadas)

[00369] QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQPPGK GLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFL KMNSLQTDDTAMYYCARIVYWGQGTLVTVSA (SEC ID N°:12).

[00370] La serie retenida de residuos de superficie para la búsqueda de la cadena ligera incluía D1, V3, A7, P9, P15, R16, E17, S18, P45, G46, Q47, D65, R79, R82, E86, K108, E110 y K112.

[00371] La consulta para la cadena ligera contiene la serie de residuos de superficie definida anteriormente y los aminoácidos conservados C23, W40, Q43, Y91, C93, F103, G104, G106 y T107, que se incluyeron para la convergencia del protocolo BLAST. Todos los demás aminoácidos podrían ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. La búsqueda BLAST se realiza frente a la base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana recopilada por el IMGT (International Immunogenetics Information Systems website, Molec Immunol, 2004, 40:647-659). Se encontró la mejor puntuación de correspondencia en X72482 (protein_id=CAA51150.1) de la que se obtiene la cadena ligera,

LC4. LC5 y LC6 son dos variantes de VL4 (VL significa ligera variable) que se ha sugerido que corrigen residuos problemáticos potenciales en la cadena ligera: 1 metionina expuesta (M51) que se mutará a Leu (LC5 & LC6) y 1 posible sitio de desamidación (LC6) en el que la asparagina N53 se cambia por un residuo de serina. En total, se proponen 3 versiones para la cadena ligera variable que contienen entre 4 y 6 mutaciones en comparación con el clon murino progenitor 16D7. Las mutaciones correspondientes se proporcionan en la siguiente Tabla 1. Se proporcionan la numeración secuencial y la numeración de Kabat.

[00372] La serie retenida de residuos de superficie para la cadena pesada variable incluía Q1, Q3, K5, S7, P9, L11, S15, Q16, S20, P41, G42, K43, S61, A62, K64, S65, R70, S74, Q75, Q86, T87, D88, Q103, L106, A111, A112 y K113 (numeración secuencial). Los aminoácidos invariables que se incluyeron en la incógnita de BLAST para la convergencia de la búsqueda fueron: C22, W36, I37, Q39, D89, Y93, C95, W101, G102, G104 y T105. La búsqueda BLAST se realiza frente a la base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana recopilada por IMGT. Se retiene una versión para la cadena pesada (HC3). Los dos dominios de V_H de AF062266 (protein_id=AAC18304.1) y AY393082 (protein_id=AAS86018.1), que mostraron la mejor puntuación de correspondencia para la serie de residuos de superficie, presentan una puntuación de similitud equivalente y presentan residuos de superficie idénticos. Por consiguiente, sólo se retiene una sola secuencia para la cadena pesada con diez mutaciones. No se retienen las secuencias de menor puntuación que tienen diferentes residuos de superficie porque tienen menos residuos polares, lo que sugiere una posible solubilidad reducida.

TABLA 1

Cadena Ligera (numeración secuencial)	Cadena Ligera (numeración de Kabat)	Versión 5 **(LC4)**	Versión 6 **(LC5)**	Versión 7 **(LC6)**
Ala7	Ala7	Ser	Ser	Ser
Pro9	Pro9	Leu	Leu	Leu
Arg16	Arg16	Gly	Gly	Gly
Met56	Met51	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn53	Asn	Asn	Ser
Arg82	Arg77	Lys	Lys	Lys
En total para VL		4 mutaciones	5 mutaciones	6 mutaciones

Cadena Pesada (numeración secuencial)	Cadena Pesada (numeración de Kabat)	(HC3)	(HC3)	(HC3)
Lys5	Lys5	Gln	Gln	Gln
Gln16	Gln16	Glu	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys
Gln86	Gln83	Thr	Thr	Thr
Thr87	Thr84	Ala	Ala	Ala
Asp88	Asp85	Ala	Ala	Ala
Ala111	Ala113	Ser	Ser	Ser
En total para VH		10 mutaciones	10 mutaciones	10 mutaciones

[00373] Se proponen tres versiones para la cadena ligera (LC4, LC5 and LC6). Las mutaciones individuales introducidas por la técnica de recubrimiento de las cadenas ligeras se indican en letra minúscula y están subrayadas y las CDR están subrayadas. Las secuencias sometidas a recubrimiento de las regiones variables se presentan a continuación, no se incluye el dominio constante (IgG4).

LC4:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:13)

LC5:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRlSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:14)

LC6:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRlSsnLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:15)

[00374] Se propuso una versión para la cadena pesada (VH3) (VH significa pesada variable). Las mutaciones introducidas por medio de la técnica de recubrimiento de la cadena variable están en minúsculas y subrayadas, y las CDR están subrayadas. No se incluye la secuencia del dominio constante.

HC3:

QVQLqESGPG LVAPSeSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN psLKSRLSIs KDNSkSQVFL KMNSLtaaDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS s (SEC ID N°:16)

[00375] Se generan secuencias de nucleótidos por OE-PCR y se clonaron en sitios NheI/HindIII del vector de expresión episomal pXL4214 (Durocher et al., NAR, 2002, 30(2), E9. Las secuencias tiene los codones optimizados para la expresión en células humanas. V_L se fusionó a IGKC (AAH93097). V_H se fusionó a IGHG4 (AAH25985), que carecía de la Lys C-terminal (IGHG4ΔK). Las secuencias se validaron por secuenciación de doble cadena

LC4:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLLHSSG KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGVY YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:17)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGT GACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGC ACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCC CCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCT

TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGG
CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGT
TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG
TCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAA
CGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGA
CAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:18)

LC5:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLLHSSG
KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGVY
YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:19)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGT
GACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGC
ACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCC
CCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCT
TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGG
CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGT
TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG
TCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAA
CGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGA
CAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:20)

LC6:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSISCRSSKSLLHSSG
KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGVY
YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:21)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGT
GACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGC
ACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCC
CCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCT
TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGG
CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGT
TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG
TCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAA
CGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGA
CAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGAC
CAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:22)

<u>HC3:</u>

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVAPSESLSITCTVSGFSLIDYGV
NWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLTAADT
AMYYCARIVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLG (SEC ID N°:23)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGG

CCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCG
ACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGG
GCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCCGCC
TGAGCATCTCCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGCC
TGACCGCCGCCGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCC
AGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC
CTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCT
GGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTG
ACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCC
TGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTG
TAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCA
AGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTAG
CGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGA
GGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGC
CCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTC
AGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC
TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTC
CAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGA
GGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:24)

EJEMPLO 15: HUMANIZACIÓN

[00376] Las secuencias de V_L y V_H de 16D7 se someten a una búsqueda Blast y los homólogos más parecidos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con puntuaciones de similitud equivalentes. 1MJU se retiene como plantilla debido a la alta precisión de la estructura cristalina, que se había determinado a una resolución de 1,22 Å. Se descubrió que el homólogo más parecido para la cadena pesada era 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000). Las estructuras 1MJU y 1FNS se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a minimización de la energía utilizando procedimientos convencionales. Posteriormente se realiza un cálculo de dinámica molecular (MD) de un

modelo de homología 3D de 16D7 durante 1,7 nanosegundos en disolvente implícito Generalized Born (véase Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499).

[00377] La MD empieza con la inicialización de las velocidades desde una distribución gausiana a 298,15° K, seguido de un periodo de equilibrio de 300 ps. Durante la MD, todos los enlaces se restringen utilizando el algoritmo SHAKE (véase Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), el paso de tiempo fue de 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración de Verlet, se realiza en el conjunto NVT canónico (número de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 298,15°K. Durante el periodo de producción, se almacenan 1.700 fotos, una cada 1 ps. Las 1.700 conformaciones del anticuerpo de murino constituyen el conjunto sobre el cual se realiza el siguiente análisis para identificar los residuos más flexibles. Para codificar el siguiente análisis se utiliza el Scientific Vector Language (SVL), disponible dentro del entorno de modelado molecular MOE (Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada). En primer lugar, cada foto, N, se superpuso de manera óptima sobre su predecesor, la foto N-1, para controlar los movimientos rotacionales y traslacionales globales que se producen durante el modelado MD y el cálculo. La superposición se obtiene minimizando la distancia de desviación media cuadrática (Root Mean Square Distance) (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos fotos. En el ejercicio de superposición sólo se consideran los átomos pesados de la cadena principal de anticuerpo. utilizando el mismo método de superposición, cada foto se superpuso después sobre la foto medoid. La foto medoïd es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más parecidas a las coordenadas promediadas de todas las conformaciones.

[00378] para cada resto de anticuerpo i, se calcularon las RMSD entre los átomos pesados de la conformación j y una conformación k de referencia medoïd. La RMSD tiene la siguiente fórmula: $RMSDj=\sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{m}(d_{lk})^2}{m}}$, definiéndose d_{lk} como la distancia euclídea expresada en Angstroms (Å) entre el átomo pesado l del resto j y su homólogo de la conformación k de referencia medoïd. Para la asociación por parejas de los átomos pesados l, también se consideró la simetría de los átomos pesados de la cadena lateral para los aminoácidos, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr. la conformación k de referencia varía de un resto a otro, y corresponde a la conformación k medoïd con la distancia euclídea más próxima a las coordenadas medias de todas las conformaciones del resto estudiado i. Entonces, para cada resto i, se obtiene una distribución de 1.700 valores de RMSD, que refleja la variación de coordenadas del resto i en el transcurso de la MD. Por medio de la

agregación de todos los valores de RMSD de todos los residuos del anticuerpo estudiado, se obtiene una distribución global de todas las RMSD. La distribución global de todas las RMSD después se utiliza como distribución de referencia. Cuando el resto i era muy flexible, se realizaba un ensayo estadístico para decidir si la RMSD media observada del resto i, m_i, era significativamente mayor que la RMSD media global para todos los residuos, m_g. Como la muestra es grande, por ejemplo, 1.700 para el análisis del clon 16D7, se utiliza un ensayo Z unilateral (véase Dorofeev & Grant, "Statistics for real-life sample surveys. Non-simple-random samples and weighted data" 2006. Cambridge University Press) siendo la hipótesis nula H_0 que "el valor de m_i observado es menor que el valor de m_g global" para calcular el parámetro estadístico Z_i de acuerdo con la fórmula: $Zi=\frac{(m_i-m_{global})}{\sqrt{\frac{sd_i}{n}}}$, donde m_i es la RMSD media calculada a partir de la distribución de RMSD del resto i, m_g es la RMSD media calculada a partir de la distribución de RMSD global, sd_i es la desviación típica calculada a partir de la distribución de RMSD del resto i y n es el tamaño de la muestra, es decir n=1.700 para el análisis del clon 16D7. El Zi calculado después se compara con las probabilidades acumulativas de la distribución normal estándar para evaluar un nivel de significado de 99,9% de la hipótesis alternativa, es decir, que "el valor de m_i observado es mayor que el valor de m_g global". esto correspondía a un $Zi \geq 3,08$. El parámetro estadístico Zi, que puede considerarse una puntuación de la flexibilidad, no está correlacionado ni con el peso molecular ni con el número de átomos pesados del resto de anticuerpo (r^2=0,014 y 0,0009, respectivamente cuando se analiza la MD del modelo de 16D7 anti-CXCR5).

[00379] La serie de residuos flexibles para la cadena ligera incluye los siguientes residuos (numeración secuencial): D1, T14, P15, R16, E17, Q47, D65, S72 R79, R82, E86, K108, E110 y K112; y para la cadena pesada incluyen los siguientes residuos: Q1, V2, Q3, L11, S15, Q16, S61, A62, K64, S65, R70, D72, Q75, K81, M82, N83, Q86, Q103, S110, A111, A112 y K113. Las partes flexibles de 16D7 se comparan con las posiciones correspondientes de las secuencias de anticuerpo humano en la versión de septiembre de 2005 de la página web ImMunoGeneTics Database.

[00380] Se retienen para la búsqueda los residuos que presentan una puntuación de alta flexibilidad significativa y unos pocos residuos de estructura que conservan las estructuras 3D de los residuos flexibles.

[00381] Se eligió la región variable de anticuerpo humano con los residuos flexibles más parecidos, dando una consideración especial a posiciones que están a una distancia menor o igual a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar los residuos flexibles de región

variable del anticuerpo murino 16D7. Las secuencias humanizadas resultantes se someten a una búsqueda Blast de similitud de secuencia en la base de datos UniProtKB/SwissProt confirmando que se habían hecho suposiciones razonables. Todas las secuencias mostraron un alto grado de similitud con varios anticuerpos humanos. Además, ninguna de las secuencias contiene ningún epítopo de células B o de células T indicado en la base de datos IEDB.

[00382] La mejor correspondencia de secuencia en la IEDB para la cadena ligera (LC1, LC2 and LC3) fue KPGQPPRLLIYDASNRATGIPA (SEC ID N°:25), que incluye la CDR2 pero tiene una diferencia de residuos significativa tipificada por una identidad de secuencia de 56% obtenida a partir de una búsqueda BLAST dentro de la base de datos IEDB.

[00383] La mejor correspondencia en la IEDB para la cadena pesada (HC1 y HC2) fue TDDTAMYYCARI (SEC ID N°:26) que está localizada antes de inicio de la CDR3. La secuencia presenta una identidad de secuencia de 61% con el péptido SEDSALYYCARD (SEC ID N°:27), lo cual hace que sea poco probable que sea un epítopo de célula T humana (J Exp Med (1995) 181, 1540)

[00384] Las secuencias originales de los dominios variables de 16D7 murino son:

[00385] cadena ligera (CDR subrayadas):

[00386] DIVMTQAAPS VAVTPRESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:28); y

[00387] cadena pesada (CDR subrayadas):

[00388] QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN SALKSRLSIR KDNSQSQVFL KMNSLQTDDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS A (SEC ID N°:29).

[00389] Se sugirieron dos versiones para la cadena pesada (HC1 & HC2) y tres versiones para la cadena ligera (LC1, LC2 and LC3). Las dos versiones de la cadena pesada proceden de AF262096/AAF79987 y AB063657/BAC01285.1, respectivamente. Las dos secuencias presentan una puntuación de similitud equivalente, pero se mantienen porque las series de residuos a mutar parecen ser relativamente diferentes y presentan diferentes propiedades fisicoquímicas. La secuencia de LC1 procede de BAC01682/AB064054.1 y sólo hay dos residuos a mutar. LC2 y LC3 son variantes de LC1 que se sugiere que solucionan posibles residuos problemáticos en la cadena ligera: una metionina expuesta (M51) mutada a Leu (versiones 3 y 4) y un posible sitio de desamidación (versión 4) en el que la asparagina,

N53, se cambia por un resto de serina. No se retienen todas las combinaciones, sino que cuatro cubren la mayoría de los puntos clave a tratar. Se usa la numeración de Kabat.

Tabla 2

Cadena Ligera **(numeración secuencial)**	Cadena Ligera **(numeración de Kabat)**	Versión 1 **(LC1)**	Versión 2 **(LC1)**	Versión 3 **(LC2)**	Versión 4 **(LC3)**
Arg16	Arg16	Gly	Gly	Gly	Gly
Glu17	Glu17	Ala	Ala	Ala	Ala
Met56	Met51	Met	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn53	Asn	Asn	Asn	Ser
	En total para VL	2 mutaciones	2 mutaciones	3 mutaciones	4 mutaciones
Cadena Pesada	Cadena Pesada	**(HC1)**	**(HC2)**	**(HC1)**	**(HC1)**
Gln1	Gln1	Gln	Glu	Gln	Gln
Ser15	Ser15	Ser	Gly	Ser	Ser
Gln16	Gln16	Glu	Gly	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Ala	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Pro	Ser	Ser
Ser65	Ser65	Ser	Gly	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys	Lys
Lys81	Lys81	Lys	Gln	Lys	Lys
Met82	Met82	Val	Met	Val	Val
Asn83	Asn82A	Thr	Asn	Thr	Thr
Gln86	Gln83	Thr	Lys	Thr	Thr
Ala111	Ala113	Ala	Ser	Ala	Ala
	En total para VH	8 mutaciones	11 mutaciones	8 mutaciones	8 mutaciones

[00390] Las mutaciones introducidas por medio de humanización de las cadenas variables están en minúsculas y subrayadas, y las CDR están subrayadas. No se incluyen los dominios constantes.

LC1:

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:30)

LC2:

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRISNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:31)

LC3:

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ LLIYRISsLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:32)

HC1:

QVQLKESGPG LVAPSeSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN psLKSRLSIs KDNSkSQVFL KvtSLtTDDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS A (SEC ID N°:33)

HC2:

eVQLKESGPG LVAPggSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN apLKgRLSIs KDNSkSQVFL qMNSLkTDDT AMYYCARIVY WGQGTLVTVS s (SEC ID N°:34)

[00391] Las secuencias de las construcciones quiméricas son las siguientes:

Secuencia de LC Quimérica

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLLHSSG KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVY YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH

QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:35)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGT
GACCCCCCGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCA
CAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTT
CAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTT
CGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTT
CATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGT
CTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACC
AAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:36)

Secuencia de HC Quimérica

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGV
NWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKMNSLQTDDT
AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLG (SEC ID N°:37)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGG
CCCCCAGCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCG
ACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGG
GCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGCC
TGAGCATCCGCAAGGACAACAGCCAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAACAGC
CTGCAGACCGACGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGC

CAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTC
CCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCC
TGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCT
GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCC
CTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCT
GTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCC
AAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTA
GCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGG
AGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTG
CCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCT
CAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGT
CCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGG
AGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:38)

Secuencias de VL Humanizadas

LC1:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLLHSSG
KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVY
YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:39)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGT
GACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCA
CAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCC

CCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTT
CAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTT
CGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTT
CATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGT
CTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACC
AAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:40)

LC2:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLLHSSG
KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVY
YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:41)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGT
GACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCA
CAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTT
CAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTT
CGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTT
CATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGT
CTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACC
AAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:42)

LC3:

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLLHSSG
KTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVY
YCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:43)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGT
GACCCCCGGCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCA
CAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCC
CCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTT
CAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTT
CGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTT
CATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGT
CTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACC
AAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:44)

Secuencias de VH Humanizadas

HC1:

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSESLSITCTVSGFSLIDYGV
NWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKVTSLTTDDTA
MYYCARIVYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

LSLSLG (SEC ID N°:45)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGG
CCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCG
ACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGG
GCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCCGCC
TGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGGTGACCAGC
CTGACCACCGACGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGC
CAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTC
CCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCC
TGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCT
GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCC
CTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCT
GTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCC
AAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTA
GCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGG
AGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTG
CCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCT
CAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGT
CCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGG
AGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:46)

HC2:

MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLKESGPGLVAPGGSLSITCTVSGFSLIDYGV
NWIRQPPGKGLEWLGVIWGDGTTYYNAPLKGRLSISKDNSKSQVFLQMNSLKTDDT
AMYYCARIVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK

VDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLG (SEC ID N°:47)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCTGGTGGCCACCGC
CACCGGCGTGCACAGCGAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGG
CCCCCGGCGGCAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCG
ACTACGGCGTGAACTGGATCCGCCAGCCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGG
GCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACCTACTACAACGCCCCCCTGAAGGGCCGCC
TGAGCATCAGCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCTGCAGATGAACAGC
CTGAAGACCGACGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGC
CAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTC
CCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCC
TGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCT
GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCC
CTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCT
GTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCC
AAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTA
GCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGG
AGGAGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTG
CCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCT
CAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGT
CCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGG
AGGGCAACGTCTTTTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:48)

EJEMPLO 16:

HUMANIZACIÓN BASADA EN TRAYECTORIAS DINÁMICAS MOLECULARES

[00392] Se hace búsqueda en la base de datos blasted de las secuencias de las secuencias VC y VH del 16D7 en la base de datos de proteínas (PDB) (Berman et al, Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242) y los homólogos más cercanos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con clasificaciones de similitud equivalentes. El 1MJU se retiene como plantilla de vida se adapta a exactitud en la estructura de cristal, que se ha determinado hasta una resolución de 1.22Å. El homologo más cercano para la cadena pesada se encuentra que es el 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884,2000). Las estructuras, 1MJU y 1FNS, se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que tiene energía minimizada posteriormente utilizando procedimiento estándar.

[00393] Se desarrolla posteriormente una simulación dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D del 16D7 para 1.1 nanosegundos (ns) en disolvente implícito Nacido Generalizado (ver GalJicchio & Lev)', J Comput Chem 20(H, 25:479-499).La simulación MD empieza por la inicialización de las velocidades a partir de una distribución Gaussiana a 500K, seguido por un periodo de equilibrio de 200 picos segundo (ps). Durante la simulación MD, se restringen todos los enlaces utilizando el algoritmo SHAKE (ver Bmth. et al., J COUlp Chem, 1995, 16: 1192-1209), el tiempo de la etapa es de 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración Verlet, se corre en NVT canónico (número de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 500K. Esta simulación se hace con restricciones armónicas aplicadas a los átomos de estructura. Se extraen 10 conformaciones diversas, una cada 100 ps, durante por lo menos 1ns de esta primer simulación.

[00394] Estas 10 conformaciones diversas se utilizan después como 10 puntos de partidas diversos para correr 10 simulaciones dinámicas moleculares, sin restricciones en la estructura, a una temperatura de 300K durante 2.3ns en disolvente implícito Nacido Generalizado. Cada simulación MD empieza por una inicialización de las velocidades a partir de una distribución Gaussiana de 298.15K, seguido por un periodo de equilibrio 300ps. Todos los enlaces se restringen utilizando el algoritmo SHAKE (ver Barth. et aL, J Comp Chem, .1995, 16:1192-1209), el tiempo de la etapa es de 1fs, y la simulación, se basa en el algoritmo de integración Verlet, se corre ensamble NVT (numero de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 298.15K. durante el periodo de producción, se almacenan 2.000 instantáneas una cada 1ps. El Lenguaje de Vector Científico (SVL), disponible dentro del ambiente de modelamiento molecular (MOE) (Molecular Operating Enviromnent

(MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada), se utiliza para codificar el siguiente protocolo post-tratamiento.

[00395] Primero, cada instantánea, N, se superpone óptimamente sobre su predecesor, la instantánea N-1, para descartar el movimiento rotacional y trasnacional general que ocurre durante el modelamiento MD y el cálculo. Se obtiene la superposición al minimizar la raíz cuadrada de la distancia (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos instantáneas. Solo los átomos pesados de la estructura del anticuerpo se consideran en la operación de superposición. Utilizando el mismo método de superposición, se superpone cada instantánea sobre la instantánea medoïd. La instantánea medoïd es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más cercanas desde las coordenadas promedio de todas las conformaciones. Para cada una de las de las 10 simulaciones MD, se utilizan las últimas 2.000 conformaciones para cuantificar, para cada aminoácido de anticuerpo de murino, la desviación de las posiciones atómicas con respecto a una conformación medoïd del aminoácido. Para cada uno de los residuos de anticuerpo i, el RMSD entre los átomos pesados de la conformación J y un metoïd de referencia de conformación K. El RMSD tiene la siguiente fórmula, con dLK definido como la distancia Euclidiana expresada en Angstroms (Å) entre el átomo pesado l del residuo j y su contraparte de la conformación de referencia medoïd K. Para la asociación en forma de pares de átomos pesados l. la simetría de los átomos de cadena pesada laterales para los aminoácidos Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr, también se considera. La conformación de referencia K varia de un residuo a otro y corresponde a la conformación medoïd K con la distancia Euclidiana más cercana a las coordenadas promedio de todas las conformaciones del residuo i estudiado.

[00396] Se encuentran mutaciones humanizantes al determinar cual línea germinal de anticuerpo humano es la más similar al anticuerpo de murino en términos de sus aminoácidos más flexibles. Para hacer eso, se comparan los movimientos de los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo de murino durante 20ns (10 x 2ns) de estimulación dinámica molecular, con los movimientos de los aminoácidos correspondientes de 49 modelos de homología de líneas germinales de anticuerpo humano, para cada una de las cuales se han corrido 10 simulaciones dinámicas moléculas utilizándole mismo protocolo. Los 49 modelos de homología 3D de las líneas germinales de anticuerpo humano se construyen al combinar sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes (vκl, vκ2, vκ3, vκ4, vλ1, vλ2, vλ3) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes (vhla, vhlb, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nudeic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

[00397] Se excluyen los 60 aminoácidos más flexibles de cualquier aminoácido en la CDR, y su vecindad inmediata, es decir aminoácidos con un carbono α a una distancia de menos 5Å a cualquier carbono α de aminoácidos CDR como se ve en el modelo de homología 3D.

[00398] La flexibilidad cuantifica al comparar RMSD (Fi) de un aminoácido dado (i) con su conformación medoïd como se define previamente, promediado sobre 10 simulaciones dinámicas moleculares, con el RMSD (Fm) de todos los aminoácidos del anticuerpo de murino, promediados sobre las mismas 10 simulaciones dinámicas moleculares. Se considera un aminoácido suficientemente flexible para interactuar potencialmente con los receptores de células T, y activan una respuesta inmunológica, si la clasificación de flexibilidad Zi, definida como Zi= (Fl-Fm)/Fm, está por encima de 0.5.

[00399] Utilizando este protocolo de estimación de flexibilidad promedio dinámico molecular, se han considerado 23 aminoácidos como flexibles en la región variable durante 16D7 de murino que excluye la región CDR y su vecindad inmediata.

[00400] El conjunto de residuos flexibles de cadena ligera incluye los siguientes residuos (numeración secuencial): R16, EI7, R44, G46, Q47, S48, R79, R82, E84, E86, y E 110; y para la cadena pesada incluyen los siguientes residuos: K5, P41, G42, K43, K64, InO, D72: N73, S74, Q75, Q86, y Q103.

[00401] La similitud cuatridimensional del anticuerpo de murino para los modelos 49 de homologia de línea germinal humana se cuantifican al muestrear las posiciones de los átomos específicos de los 60 aminoácidos flexibles, utilizando todas las instantáneas de picosegundos de las 10 simulaciones dinámicas moleculares, por medio de única rejilla cúbica tridimensional. Esta rejilla tiene una resolución de 1Å. La rejilla tridimensional se hace de 445.740 puntos y se ha inicializado utilizando la estructura tridimensional de un modelo cristalográfico de anticuerpo humano basado en anticuerpo, 8FAB (Biochem 30:3739-3748,. 1991). También se utiliza el modelo 8FAB para posicionar todas las conformaciones instantáneas de picosegundos de un anticuerpo que se muestrean en la rejilla tridimensional. Para este propósito, la conformación medoïd de la dinámica molecular del anticuerpo se superpone sobre el modelo 8FAB. Esta superposición consiste de alineamiento de los momentos de inercia de los dos modelos, seguido por la minimización de las distancias escalables entre los carbonos λ de ambos modelos. Todas las conformaciones restantes de la simulación dinámica molecular se sobreponen sobre la conformación medoïd utilizando el mismo método.

[00402] Se hacen dos tipos de muestreo que resultan en dos similitudes (similitud electrostática y similitud lipófila), para un par de anticuerpos que se comparan. Estas dos

similitudes se agregan luego para obtener la similitud total. El muestreo electroestático considera todos los átomos de la cadena lateral de aminoácidos. El valor de un punto, x, de la rejilla se obtiene al aplicar una función Gaussiana tridimensional ponderada f(x) con la carga parcial atómica como se describe en el campo de fuerza Amber 99 (Cicplak et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22: 1048-1 057). La función f(x) se aplica a los 3 ejes de coordenadas cartesianas utilizando la siguiente fórmula:

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

,x y u son, respectivamente, las coordenadas cartesianas de un punto de rejilla y un átomo de aminoácido muestreado, y s=r/1.6 (r = residuo de covalencia del átomo). El muestreo se repite para todas las conformaciones del aminoácido y los resultados obtenidos se promedian en todos los puntos de la rejilla tridimensional. El muestreo lipófilo considera solo los átomos lipófilos de la cadena lateral de aminoácidos. El valor de un punto en la rejilla se calcula con la misma función Gaussiana f(x) sin promediar. Como un resultado, los dos ensambles de conformaciones instantáneas de picosegundos de las simulaciones dinámicas moleculares, de los dos anticuerpos se comparan y se muestrean por la misma rejilla tridimensional. Se puede calcular la similitud electrostática (sim-elec), entre el anticuerpo a y el anticuerpo b, con la siguiente fórmula:

$$sim-elec = \frac{\sum_{i=1}^{445240} \left(\left|x_i^a + x_i^b\right| - \left|x_i^a - x_i^b\right|\right)}{\sum_{i=1}^{445240} \left(\left|x_i^a + x_i^b\right|\right)}.$$

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

[00403] El modelo de línea germinal humana de vλ2-vh4 presenta la más alta similitud cutridimensional (similitud total=50%) de sus 60 aminoácidos más flexibles con respecto a los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo de murino 16D7. El modelo de línea germinal humana vλ2-vh4 se ha utilizado aquí para reemplazar a los residuos flexibles de anticuerpo de murino 16D7. De antemano, los aminoácidos de las dos secuencias se alinean de acuerdo a la superposición óptima de los carbonos α de los modelos de homología correspondientes 3D. Se buscan motivos indeseados en las secuencias humanizadas resultantes utilizando una búsqueda blast, como se describió previamente en el párrafo 41 anterior. Adicionalmente, se buscan epítopos de células T o células B conocidos en las secuencias humanas resultantes utilizando la base de datos IEDB como se describe en el párrafo 44, anterior.

[00404] La mejor coincidencia de secuencia en el IEDB para la cadena liviana (LC7) es PGKAPQL.LIYRl'vlSNL, (SEQ rD NO: 52), que cubre la CDR2. La secuencia presenta 73% de identidad de secuencia con el péptido PGKAPKLLIYAASSL (SEQ JD NO:53) que muestra unión HL.A-DRBl 0404* pero no se ha demostrado que sea inmunogénico en el hombre (J Inmmnol (1995) 155, 5(55).[00405J

[00405] La mejor coincidencia en el IEDB para la cadena pesada (HC4 y HC5) es SLIDYGVN\VIRQPPG (SEQ ID NO: 54) que cubre la CDRl pero tiene diferencia de residuos significativa como se tipifica por el 40% de identidad de secuencia obtenida de una búsqueda BLAST dentro de la base de datos lEOB.

[00406] Se obtienen dos versiones para la cadena pesada (HC4 & HC5) y una versión para la cadena ligera (Le7). Ambas versiones de la cadena pesada se derivan del modelo de línea germinal humana de vλ2-vλ4. El HC5 es una variante del HC4 con una mutación adicional para superar un residuo problemático potencial: un sitio de desamidación potencial en donde la asparagina, N60, se cambia a un residuo prolina.

[00407] La mutación se introduce a través de la humanización de las cadenas variables que están en minúsculas y subrayadas y las CDR están subrayadas. No se incluyen los dominios constantes.

LC7:

DIVMTQAAPSVAVTPgqSVSISCRSSKSLLHSSGKTYLYWFLQhPGkaPQ LLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLtISgVgAEDVGVYYCMQHLEYP YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:55)

HC4:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYNSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLtTDDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:56)

HC5:

QVQLqESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP PGKGLEWLGVIWGDGTTYYpSALKSRLSIsKDtSkSQVFLKMNSLtTDDT AMYYCARIVYWGQGTLVTVSAAK (SEQ ID NO:57)

Cadena Ligera **(numeración secuencial)**	(LC7)	
ARG16	GLY	
GLU17	GLN	

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

EJEMPLO 17: FARMACOCINÉTICA

[00408] El estudio se realiza con un número adecuado de animales (por ejemplo, 4 en un estudio; 2 para una sola dosis y 2 para dosis repetidas, 5 dosis por semana) sanos, macacos criados para este fin que pesaban entre 2,0 y 5,4 kg y con edades que variaban entre 2 y 7 años. Los animales pueden asignarse a dos grupos de tratamiento, uno que recibe anticuerpos IgG4 de control y otro que recibe 16D7 humanizado. A los monos de cada grupo se les administra una sola dosis intravenosa en embolada, por ejemplo, 2,5-10 mg/kg en un volumen de dosis de 2-3 ml/kg, o 5 dosis por semana, i.v. Se recogen muestras de sangre a diversos puntos de tiempo después de cada administración de la dosis y se procesan para obtener plasma. Las muestras de plasma se analizan con respecto a la concentración de IgG4 total y mAb CXCR5 utilizando un ELISA.

EJEMPLO 18: ESTUDIOS COMPARATIVOS

[00409] Algunos de los anticuerpos de la presente invención se comparan con anticuerpos disponibles en el mercado en experimentos paralelos. MAB190, disponible en R & D Systems, es un mAb de ratón. RF82B es un anticuerpo de rata anti-CXCR5 humano disponible en BD. El clon 2C1 es un mAb de ratón con un marcador GST disponible en Abnova. Los diversos anticuerpos humanizados descritos aquí se isotipifican utilizando reactivos y métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enseñados aquí tienen una

cadena ligera κ, muchos son IgG1, mientras que 46C9, 68D3 y H28 son IgG2a. La mayoría de los anticuerpos se unen al extremo amino de CXCR5, y varios de los anticuerpos compiten entre sí por la unión al mismo epítopo o región.

[00410] El anticuerpo BD se une débilmente a PBMC humanas.

[00411] Aunque los anticuerpos generalmente no se unían a células de macaco, los anticuerpos 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 de la presente invención si lo hacían.

[00412] Se descubrió que 16D7 tenía mayor afinidad, por lo menos 10 veces más, que los anticuerpos comerciales, y tiene una velocidad de inactivación 100 veces mejor que los otros anticuerpos.

EJEMPLO 18: AUMENTO A ESCALA

[00413] Cada variante de anticuerpo monoclonal se produjo en células HEK293 FS™ cultivadas en suspensión por transfección transitoria de dos plásmidos de expresión que codificaban la cadena pesada o ligera complejados con 293fectin™ (Invitrogen). Las proteínas secretadas se recogen ocho días después de la transfección y se centrifugan. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína A (ProSepvA, Millipore) después de la elución de la columna con amortiguador citrato 25 mM pH 3, NaCl 0,15 M. Los anticuerpos monoclonales se formularon en PBS y se filtraron a través de filtros de 0,22 µm. La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia a 280 nm. Cada lote se analiza por SDS-PAGE (Nupage Bistris/ MES-SDS 10%) en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero. Cada lote de proteína también se analiza por exclusión molecular (Tricorn 10/300 GL Superdex 200) para determinar la homogeneidad del monómero y la presencia de especies de alto peso molecular.

[00414] A partir de cultivos de 240 ml, se produjo un total de 30 a 40 mg de ocho anticuerpos monoclonales variantes de 16D7 y con una calidad apropiada para los ensayos posteriores *in vitro* e *in vivo*.

[00415] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de descubrir utilizando sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas aquí. Se pretende que dichos equivalentes estén englobados por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido humano o humanizado que se une específicamente al dominio extracelular de CXCR5 humano.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo.

3. El polipéptido de la reivindicación 2, que comprende además una región constante.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, que comprende un C_{H1}, C_{H2} y C_{H3} o sus combinaciones.

5. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde la región constante es de un anticuerpo IgG.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG4.

7. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.

8. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.

9. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 8.

10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende el polipéptido de la reivindicación 1.

11. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende además una cadena ligera variable.

12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende además una región variable de una cadena pesada.

13. El polipéptido de la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende un Fv monocatenario.

14. Un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno que comprende células positivas para CXCR5, que comprende administrar a dicho paciente un antagonista de CXCR5, que se une al CXCR5.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho antagonista comprende el polipéptido de la reivindicación 1.

16. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 es una célula B.

17. El método de la reivindicación 14, en donde dicho trastorno es artritis.

18. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 se activa por CXCL13.

19. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 es una célula T.

20. Un método para preparar el polipéptido de la reivindicación 1, que comprende:

(a) identificar una región variable humana homóloga a una región variable de un anticuerpo para CXCR5 no humano;

(b) identificar a partir de conformaciones moleculares de una región variable de dicho anticuerpo para CXCR5 no humano, aminoácidos que sean flexibles y aminoácidos que flanquean dicho residuo flexible y retienen la conformación molecular de dicha región variable;

(c) identificar aminoácidos homólogos a dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) en dicha región variable humana;

(d) reemplazar dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) por dichos aminoácidos identificados de la etapa (c) para producir una región variable humanizada; y

(e) unir dicha región variable humanizada de la etapa (d) con una secuencia humana para producir un polipéptido humanizado que se une específicamente al CXCR5.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha etapa (b) comprende modelado dinámico molecular.

22. El método de la reivindicación 20, en donde la etapa (d) comprende no reemplazar aminoácidos mayores de 5 Å de una región determinante de complementariedad.

23. El método de la reivindicación 20, que confirma adicionalmente que dicha región variable humanizada de la etapa (d) se parece a un anticuerpo humano al comparar dicha secuencia de región variable humanizada con las secuencias de una colección de secuencias de anticuerpos humanos.

24. El método de la reivindicación 20, que confirma adicionalmente dicha región variable humanizada de la etapa (d) se parece a un anticuerpo humano al comparar dicha trayectoria de región variable humanizada con las secuencias de una colección de trayectorias de anticuerpo humano.

25. El método de la reivindicación 20 en donde la región variable humanizada de la etapa (d) no comprende un epítopo de células B o un epítopo de células T.

RESUMEN

La presente invención se relaciona a anticuerpos humanizados que se unen específicamente al CXCR5 y, por ejemplo, pueden inhibir la función de CXCR5. La invención también incluye usos de los anticuerpos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos relacionados con CXCR5.

SLText
SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> HUMANIZED ANTI-CXCR5 ANTIBODIES, DERIVATIVES THEREOF
AND THEIR USE

<130> 190809-14330601

<140>
<141>

<150> 60/968,792
<151> 2007-08-29

<160> 57

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Asn Tyr Pro Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15

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

Asn His Leu Cys
35

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<220>
<221> modified_base
<222> (18)
<223> a, c, g or t

<400> 2
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<220>
<221> modified_base
<222> (18)
<223> a, c, g or t

<400> 3
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 4
ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt tttggc 36

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 5
ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

<210> 6
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 6
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggtgc 46

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 7
ccaagctgtg tcctrtcc 18

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 8
cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc 32

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 9
wtctctrgag tcagtggg 18

<210> 10

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 10
cgactagtcg actggtggga agatggatac ag 32

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 12
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

```
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
     50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys
 65                  70                  75                  80

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

His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 16

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
            20                  25                  30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
         35                  40                  45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
     50                  55                  60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65                  70                  75                  80

Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
                 85                  90                  95

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 17
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val
            20                  25                  30

Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
         35                  40                  45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
     50                  55                  60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
```

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 18
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 18
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 19
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 19
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val
20 25 30

Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 20
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 20
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 21
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 21
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Leu Ser Val Ala Val

20 25 30

Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 22
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 22
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccagagcgcc ctcagcgtgg ccgtgacccc cggcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcagc 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
aagatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
tacccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 23
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
```

385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455

<210> 24
<211> 1385
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 24
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgca ggagagcggc cccggcctgg tggccccccag cgagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacccca gcctgaagag ccgcctgagc atctccaagg acaacagcaa gagccaggtg 300
ttcctgaaga tgaacagcct gaccgccgcc gacaccgcca tgtactactg cgcccgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggcccctg ctcccggtcc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttcctc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgccctg cccctgagtt cctgggcgga cctagcgtgt tcctgttccc tcctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccggtgg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt 1385

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg
1 5 10 15

Ala Thr Gly Ile Pro Ala
20

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26
Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile
1 5 10

<210> 27

<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
1 5 10

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 30

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

Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
             20                  25                  30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
     50                  55                  60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 31
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 31

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

Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
             20                  25                  30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

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

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

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32

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

Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
             20                  25                  30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
         35                  40                  45

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

```
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65                  70                  75                  80

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

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110


<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 33
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu
  1               5                  10                  15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
             20                  25                  30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
         35                  40                  45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
     50                  55                  60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65                  70                  75                  80

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

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
            100                 105                 110


<210> 34
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 34
Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
  1               5                  10                  15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
             20                  25                  30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
         35                  40                  45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ala Pro Leu Lys
     50                  55                  60

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

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

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 35
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 35
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val
20 25 30

Thr Pro Arg Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 36
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 36
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc ccgcgagagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
tacccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540

ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 37
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455

<210> 38
<211> 1385
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 38
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggccccag ccagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacagcg ccctgaagag ccgcctgagc atccgcaagg acaacagcca gagccaggtg 300
ttcctgaaga tgaacagcct gcagaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcccgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcgccg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggccccttg ctcccggtcc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttcctc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgccctg cccctgagtt cctgggcgga cctagcgtgt tcctgttccc tcctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccggtgg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt 1385

<210> 39
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 39

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val
            20                  25                  30

Thr Pro Gly Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
        35                  40                  45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 40
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 40
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc cggcgccagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg catgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t   731

<210> 41
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 41
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val
20 25 30

Thr Pro Gly Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 42
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 42
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc cggcgccagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcaac 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
tacccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420
tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 43
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 43
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val
20 25 30

Thr Pro Gly Ala Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Leu Ser Ser Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 44
<211> 731
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 44
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgaca tcgtgatgac ccaggccgcc cccagcgtgg ccgtgacccc cggcgccagc 120
gtgagcatca gctgccgcag cagcaagagc ctgctgcaca gcagcggcaa gacctacctg 180
tactggttcc tgcagcgccc cggccagagc ccccagctgc tgatctaccg cctgagcagc 240
ctggccagcg gcgtgcccga ccgcttcagc ggcagcggca gcggcaccgc cttcaccctg 300
cgcatcagcc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgcatgca gcacctggag 360
taccctaca ccttcggcgg cggcaccaag ctggagatca agcgtacggt ggccgctcct 420

tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaagt ccggcaccgc ctccgtggtg 480
tgtctgctga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtggaaggt ggacaacgcc 540
ctgcagtccg gcaactccca ggagtccgtc accgagcagg actccaagga cagcacctac 600
tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 660
tgtgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa ccggggcgag 720
tgctgaagct t 731

<210> 45
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
    450                 455
```

<210> 46
<211> 1385
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 46

```
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagccagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggccccag cgagagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacccca gcctgaagag ccgcctgagc atcagcaagg acaacagcaa gagccaggtg 300
ttcctgaagg tgaccagcct gaccaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcccgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcgccg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggccccttg ctcccggtcc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttcctc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgccctg cccctgagtt cctgggcgga cctagcgtgt tcctgttccc tcctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccggtgg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt                                                             1385
```

<210> 47
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
```

SLText

385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455

<210> 48
<211> 1385
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 48
gctagcacca tgggctggag ctgcatcatc ctgttcctgg tggccaccgc caccggcgtg 60
cacagcgagg tgcagctgaa ggagagcggc cccggcctgg tggccccgg cggcagcctg 120
agcatcacct gcaccgtgag cggcttcagc ctgatcgact acggcgtgaa ctggatccgc 180
cagccccccg gcaagggcct ggagtggctg ggcgtgatct ggggcgacgg caccacctac 240
tacaacgccc ccctgaaggg ccgcctgagc atcagcaagg acaacagcaa gagccaggtg 300
ttcctgcaga tgaacagcct gaagaccgac gacaccgcca tgtactactg cgcccgcatc 360
gtgtactggg gccagggcac cctggtgacc gtgagcagcg ccagcaccaa gggcccttcc 420
gtgttccctc tggcccctg ctcccggtcc acctccgagt ccaccgccgc tctgggctgc 480
ctggtgaagg actacttccc tgagcctgtg accgtgtcct ggaactctgg cgccctgacc 540
tccggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc 600
gtggtgaccg tgccttcctc ctccctgggc accaagacct acacctgtaa cgtggaccac 660
aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagtcca agtacggccc tccttgccct 720
tcctgccctg cccctgagtt cctgggcgga cctagcgtgt tcctgttccc tcctaagcct 780
aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc 840
caggaggacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc 900
aagaccaagc ctcgggagga gcagttcaat tccacctacc gggtggtgtc tgtgctgacc 960
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa gaatacaagt gtaaggtctc caacaagggc 1020
ctgccctcct ccatcgagaa aaccatctcc aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag 1080
gtgtacaccc tgcctcctag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt 1140
ctggtgaagg gcttctaccc ttccgacatc gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct 1200
gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg ctggactccg acggctcctt cttcctgtac 1260
tccaggctga ccgtggacaa gtcccggtgg caggagggca acgtcttttc ctgctccgtg 1320
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagtccc tgtccctgtc tctgggctga 1380
agctt 1385

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

<400> 49
Glu Leu Leu Gly Gly
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Met Ile Ser Arg Thr
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
6x His tag

<400> 51
His His His His His His
1 5

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 52
Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 53
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 54
Ser Leu Ile Asp Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
1 5 10 15

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 55
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ala Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln His Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 56
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
100 105 110

Lys

<210> 57
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

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

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

Lys Met Asn Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
100 105 110

SLText

Lys

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/74381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395 (2008.04)
USPC - 435/343.1, 435/343.2, 435/70.21, 530/387.3, 530/388.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 435/343.1, 435/343.2, 435/70.21, 530/387.3, 530/388.73, 530/388.75; 530/388.1, 530/388.15, 530/387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/343.1, 435/343.2, 435/70.21, 530/387.3, 530/388.73, 530/388.75; 530/388.1, 530/388.15, 530/387.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Google Scholar, Dialog Web, USPTO patents and applications, PubMed
Search terms: antibody, antibody fragment, CD185, CXCR5, monoclonal antibody, CXCL13, BLR1, humanized antibody, humanized variable region, molecular modeling

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2005/0276812 A1 (EBENS et al.) 15 December 2005 (15.12.2005), paragraphs [0019], [0050], [0051], [0055], [0077], [0078], [0082], [0084], [0086], [0088], [0171], [0272], [0290[0088], and [0494].	1-14, 16, 18 and 19 ------- 15, 17, 20-25
Y	SCHMUTZ et al., Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5, Arthritis Res Ther, 2005, Vol 7, No 2, pp R217-R229; abstract.	17
Y	US 5,821,337 A1 (CARTER et al.) 13 October 1998 (13.10.1998), col. 4, ln. 48-51; col. 22, ln. 11-20; and figs. 1A and B; col. 22, ln. 20-45; col 20.	20-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 November 2008 (7.11.2008)	19 NOV 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

303

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2008/074381

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

NAKAMURA, Dean
MDIP LLC
Post Office Box 2630
Montgomery Village, MD 20886-2630
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
31 December 2008 (31.12.2008)

Applicant's or agent's file reference
14330601

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/074381

International filing date *(day/month/year)*
27 August 2008 (27.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
MIKOL, Vincent
43 Rue Gabrielle
F-94220 Charenton-le-Pont
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
MIKOL, Vincent
48 Rue Gabrielle
F-94220 Charenton-le-Pont
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Reyes Rosana
e-mail pt11.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 11

304

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2008/074381

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

NAKAMURA, Dean
MDIP LLC
Post Office Box 2630
Montgomery Village, MD 20886-2630
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
31 December 2008 (31.12.2008)

Applicant's or agent's file reference
14330601

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/074381

International filing date *(day/month/year)*
27 August 2008 (27.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
BAURIN, Nicholas
35 Rue De La Bretoniere
F-91180 St. Germain Les Arpajon
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BAURIN, Nicolas
35 Rue De La Bretoniere
F-91180 St. Germain Les Arpajon
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Reyes Rosana
e-mail pt11.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 11

305

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2008/074381

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

NAKAMURA, Dean
MDIP LLC
Post Office Box 2630
Montgomery Village, MD 20886-2630
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
31 December 2008 (31.12.2008)

Applicant's or agent's file reference
14330601

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/074381

International filing date *(day/month/year)*
27 August 2008 (27.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
REUTSCH, Norman
35 Apple Orchard Road
Moorestown, NJ 08057
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
RUETSCH, Norman
35 Apple Orchard Road
Moorestown, NJ 08057
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Reyes Rosana
e-mail pt11.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 11

306

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **A61K 039/395**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **SANOFI-AVENTIS**
(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País*** **60/968,792** **29/08/2007** **US**	(72) Inventor(es) **RENATA LEE Y OTROS**
	(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 29/03/2010 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27/08/2008 No. de solicitud PCT/US2008/074381	(87) Publicación internacional Fecha: 12/03/2009 N° publicación: ***WO 2009/032661 A1***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS, DERIVADOS DE LOS MISMOS Y SU USO**

Reivindicación(es):

1. Un polipéptido humano o humanizado que se une específicamente al dominio extracelular de CXCR5 humano.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo.

3. El polipéptido de la reivindicación 2, que comprende además una región constante.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, que comprende un C_{H1}, C_{H2} y C_{H3} o sus combinaciones.

5. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde la región constante es de un anticuerpo IgG.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG4.

7. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.

8. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.

9. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 8.

10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende el polipéptido de la reivindicación 1.

11. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende además una cadena ligera variable.

12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende además una región variable de una cadena pesada.

13. El polipéptido de la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende un Fv monocatenario.

14. Un método para tratar a un paciente que tiene un trastorno que comprende células positivas para CXCR5, que comprende administrar a dicho paciente un antagonista de CXCR5, que se une al CXCR5.

15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho antagonista comprende el polipéptido de la reivindicación 1.

16. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 es una célula B.

17. El método de la reivindicación 14, en donde dicho trastorno es artritis.

18. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 se activa por CXCL13.

19. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula positiva para CXCR5 es una célula T.

20. Un método para preparar el polipéptido de la reivindicación 1, que comprende:

(a) identificar una región variable humana homóloga a una región variable de un anticuerpo para CXCR5 no humano;

(b) identificar a partir de conformaciones moleculares de una región variable de dicho anticuerpo para CXCR5 no humano, aminoácidos que sean flexibles y aminoácidos que flanquean dicho residuo flexible y retienen la conformación molecular de dicha región variable;

(c) identificar aminoácidos homólogos a dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) en dicha región variable humana;

(d) reemplazar dichos aminoácidos identificados de la etapa (b) por dichos aminoácidos identificados de la etapa (c) para producir una región variable humanizada; y

(e) unir dicha región variable humanizada de la etapa (d) con una secuencia humana para producir un polipéptido humanizado que se une específicamente al CXCR5.

21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha etapa (b) comprende modelado dinámico molecular.

301

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001710[illegible]-1

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 -- 177
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-037770- -00000-0000
Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
EMILIO ACOSTA DOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754707	305663	05/01/2010	57.686.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	CONSTANTE	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 4 a 8 ? 339.000.00

****

TOTAL : $ 339.000.00

SON: TRESCIENTOS TREINTA Y NUEVE MIL PESOS

RECIBIDO

CAJERO

COPIA DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

COLO: 14775 - 841 - 120 - 0

~~COLO: 0036[illegible]-852-020-3~~

308

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 18,571
FECHA : MARZO 9 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-037770- -00000-0000
Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325689700	09/03/2010	2,560,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL : $	1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO: 14775-841-120-0

309

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 16,871
FECHA : MARZO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-037770- -00000-0000
Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	176773822	03/03/2010	39,745,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		554,000.00
		TOTAL :	$	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COCO: 14775-841-120-0

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-037770- -00000-0000
Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI-AVENTIS

REFERENCIA	Radicación No.	10 037770
	Solicitud internacional	PCT/US2008/074381
	Fecha inicio fase nacional	29/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	06392

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 MAYO 2010
adpa11