

RECEIVED
INDUSTRIAL
PROPERTY
DIVISION
BOGOTÁ, COLOMBIA
2011-04-05

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

BT

PCT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

11-42011

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

ANTICUERPOS ANTI CXCR4 NUEVOS Y SU UTILIZACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

PIERRE FABRE MEDICAMENT

DOMICILIO

BOULOGNE BILLANCOURT, FRANCIA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

01-05-2011



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



ión

No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378' FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

FORMULARIO ÚNICO 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: **PIERRE FABRE MEDICAMENT**Dirección: 45, place Abel Gance, F-92100
Boulogne-Billancourt, Francia.Nacionalidad o Domicilio: Francia.
Lugar de Constitución: Francia.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de
Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **KLINGUER-HAMOUR, Christine; GRENIER-CAUSSANEL, Véronique.**Dirección: 73, route de chez Dios-saz, Les Gortalles, F-74570 Groisy, Francia; 1 rue
de la Vie de l'Orme, F-01430 Saint Martin du Fresne, Francia; (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Francia (respectivamente).

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/062787Fecha 01.10.2009Publicación Internacional No WO 2010/037831 A1Fecha 08.04.2010

6 Título (54): ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 NUEVOS Y SU UTILIZACIÓN PARA EL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

EP

01.10.2008

08305631.7

US

01.10.2008

61/136,772

US

29.04.2009

61/173,743

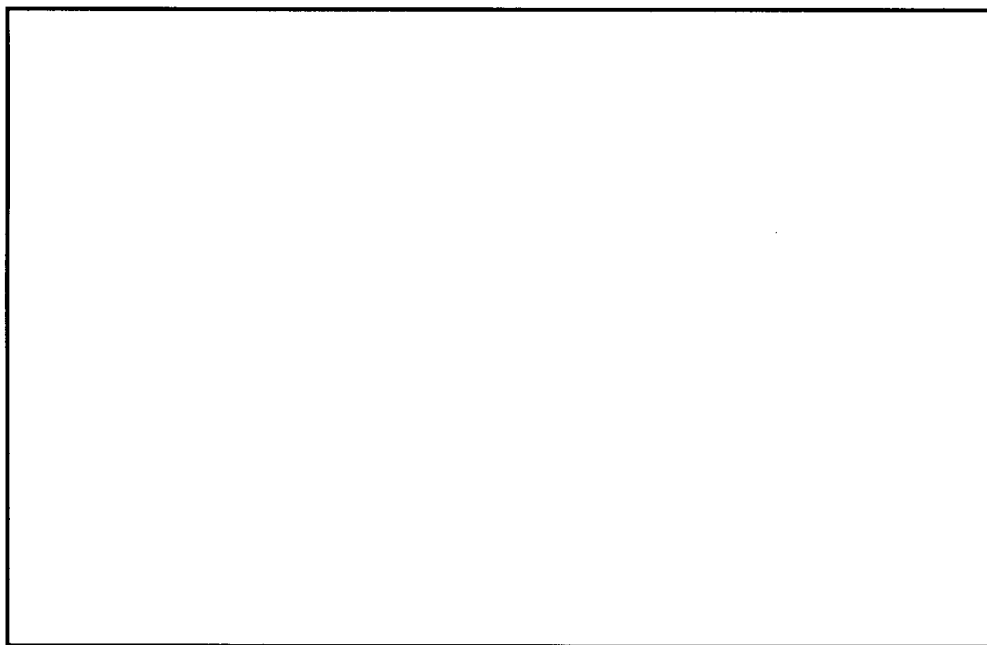
9 Comprobante de pago No. 11-17253; 11-5673; 11-7508; 11-7506; 11-5665; 11-14433 Fecha 01-04-2011

10

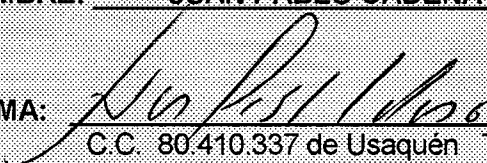
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 19.
- ☒ Otros: - Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 783.000 (29*\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUÁN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

116.523

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0017253

Bogotá D.C., Febrero 24 de 2011 - 16:29:22

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411735354	23/02/2011	45.308.400.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

*****_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 24 de 2011 - 16:29:28

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 005673

Bogotá D.C., Enero 21 de 2011 - 07:50:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411745946	20/01/2011	26.679.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	270.000.00	270.000.00
				<u>\$270.000.00</u>
			=====	

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 173

146.523

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 007508

Bogotá D.C., Enero 27 de 2011 - 08:21:51

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411745924	26/01/2011	51.520.000.00

*** Conceptos Pagados ***

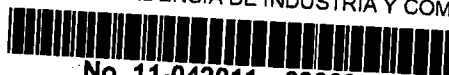
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	270.000.00	270.000.00
				\$270.000.00
			=====	

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 27 de 2011 - 08:22:26

116.523

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 007506

Bogotá D.C., Enero 27 de 2011 - 08:21:51

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411745924	26/01/2011	51.520.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011-00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 27 de 2011 - 08:22:25

116.523

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 005665

Bogotá D.C., Enero 21 de 2011 - 07:50:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

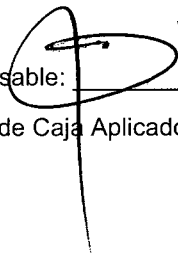
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411745946	20/01/2011	26.679.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00	54.000.00
				\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011-00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 173

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 21 de 2011 - 07:50:34

116.623

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0014433

Bogotá D.C., Febrero 16 de 2011 - 16:51:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765872	16/02/2011	32.257.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00	54.000.00
				\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 16 de 2011 - 16:51:29

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/062787

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

AHNER, Francis
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 23 July 2010 (23.07.2010)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 355540D26935	
International application No. PCT/EP2009/062787	International filing date (day/month/year) 01 October 2009 (01.10.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	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 GRENIER-CAUSSANEL, Véronique 1 rue de la Vie de l'Orme F-01430 Saint Martin du Fresne 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:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sontag Frederic e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	---

Facsimile No. +41 22 338 89 70

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 April 2010 (08.04.2010)(10) International Publication Number
WO 2010/037831 A1(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/062787

(22) International Filing Date:

1 October 2009 (01.10.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

08305631.7	1 October 2008 (01.10.2008)	EP
61/136,772	1 October 2008 (01.10.2008)	US
61/173,743	29 April 2009 (29.04.2009)	US

(71) Applicant (for all designated States except US):
PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place
Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **KLINGUER-
HAMOUR, Christine** [FR/FR]; 73, route de chez Dios-
saz, Les Gortalles, F-74570 Groisy (FR).(74) Agent: **AHNER, Francis**; Cabinet Regimbeau, 20, rue de
Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).(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, CL, 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, PE, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTI CXCR4 ANTIBODIES AND THEIR USE FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to a novel isolated antibody, or the derived compounds or functional fragments of same, capable of binding to CXCR4 but also of inducing conformational changed of the CXCR4 homodimers and/or heterodimers. More particularly, the present invention relates to the 414H5 and 515H7 antibodies, specific to the CXCR4 protein, as well as their use for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions composed of such antibodies and a process for the selection of such antibodies are also covered.

WO 2010/037831 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
 Intelectual
 Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
 08 de abril de 2010 (08.04.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/037831 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C07K 16/28 (2006.01)	(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, 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.
(21) Numero de Solicitud Internacional: PCT/EP2009/062787	
(22) Fecha de Presentación Internacional: 01 de octubre de 2009 (01.10.2009)	
(25) Lenguaje de entrega: Inglés	
(26) Lenguaje de Publicación: Inglés	
(30) Datos de la Prioridad: 08305631.7 1 de octubre de 2008 (01.10.2008) EP 61/136,772 1 de octubre de 2008 (01.10.2008) US 61/173,743 29 de abril de 2009 (29.04.2009) US	(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).	Declaraciones bajo la Regla 4.17: - sobre el derecho del solicitante para solicitar y que se le conceda una patente (Regla 4.17 (ii)) - sobre el derecho del solicitante para reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17 (iii)) - sobre la calidad del inventor (Regla 4.17 (iv))
(72) Inventores; e	
(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): KLINGUER-HAMOUR, Christine [FR/FR]; 73, route de chez Dios-saz, Les Gottalles, F-74570 Groisy (FR).	
(74) Agente: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).	Publicado: - con el informe de búsqueda internacional (Art. 21 (3)) - antes del vencimiento de la fecha límite para modificar las reivindicaciones y ser publicado nuevamente en el evento de que se reciban las modificaciones (Regla 48.2(h)). - con (una) indicación(es) en relación con material biológico depositado allegado bajo la Regla 13bis por separado de la descripción (Reglas 13bis.4(d)(i) y 48.2(a)(viii))

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 NUEVOS Y SU UTILIZACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado nuevo, o a los compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo, capaz de unirse a CXCR4 pero también inducir cambios conformacionales de los homodímeros y/o heterodímeros CXCR4. Más particularmente, la presente invención se refiere a los anticuerpos 414H5 y 515H7, específicos frente a la proteína CXCR4, así como a su utilización para el tratamiento del cáncer. También se cubren composiciones farmacéuticas compuestas por dichos anticuerpos y un procedimiento para la selección de dichos anticuerpos.

ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 NUEVOS Y SU UTILIZACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La presente invención se refiere a anticuerpos nuevos, en particular a anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados, capaces de unirse específicamente a receptores de quimiocina (CXCR) así como a las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican para dichos anticuerpos. Desde un aspecto, la invención se refiere a anticuerpos nuevos, compuestos derivados o fragmentos funcionales, que pueden unirse específicamente al CXCR4 y que presentan fuertes actividades antitumorales. La invención comprende además la utilización de dichos anticuerpos como un fármaco para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cáncer, así como en los procedimientos o kits relacionados con el diagnóstico del cáncer. Finalmente, la invención comprende composiciones que comprenden dichos anticuerpos en combinación o conjugación con otros compuestos anticancerígenos, dichos como anticuerpos, toxinas, agentes citotóxicos/citostáticos, y la utilización de los mismos para la prevención y/o el tratamiento de determinados cánceres.

Las quimiocinas son pequeños péptidos secretados que controlan la migración de leucocitos a lo largo de un gradiente químico de ligando, conocido como gradiente de quimiocina, especialmente durante las reacciones inmunitarias (Zlotnick A. *et al.*, 2000). Se dividen en dos subfamilias principales, CC y CXC, basándose en la posición de sus residuos de cisteína del extremo NH₂-terminal, y se unen a receptores acoplados a proteínas G, cuyas dos subfamilias principales se denominan CCR y CXCR. Se han descubierto hasta la fecha más de 50 quimiocinas humanas y 18 receptores de quimiocina.

Muchos cánceres presentan una compleja red de quimiocinas que influye en la infiltración de células inmunitarias del tumor, así como en el crecimiento, la supervivencia, la migración y la angiogénesis de las células tumorales. Las células inmunitarias, las células endoteliales y las propias células tumorales expresan receptores de quimiocina y pueden responder a gradientes de quimiocina. Estudios de muestras de biopsia de cáncer humano y modelos de cáncer de ratón muestran que la expresión de receptores de quimiocina en células cancerosas está asociada con el aumento de la capacidad metastásica. Las células malignas de diferentes tipos de cáncer presentan diferentes perfiles de expresión de

receptores de quimiocina, pero el receptor 4 de quimiocina (CXCR4) es el que se encuentra más comúnmente. Las células de por lo menos 23 tipos diferentes de cánceres humanos de origen epitelial, mesenquimatoso y hematopoyético expresan el receptor CXCR4 (Balkwill F. *et al.*, 2004).

El receptor 4 de quimiocina (también conocido como fusina, CD184, LESTR o HUMSTR) existe como dos isoformas que comprenden 352 ó 360 aminoácidos. El residuo Asn11 está glicosilado, el residuo Tyr21 está modificado mediante la adición de un grupo sulfato y las Cys 109 y 186 están unidas con un puente disulfuro sobre la parte extracelular del receptor (Juarez J. *et al.*, 2004).

Este receptor se expresa por diferentes tipos de tejidos normales, sin tratar, células T que no son de memoria, células T reguladoras, células B, neutrófilos, células endoteliales, monocitos primarios, células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales, células madre hematopoyéticas CD34+ y a un bajo nivel en corazón, colon, hígado, riñones y cerebro. CXCR4 desempeña un papel clave en el tráfico de leucocitos, la linfopoyesis de células B y la mielopoyesis.

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

El único ligando del receptor CXCR4 descrito hasta la fecha es el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) o CXCL12. SDF-1 se secreta en gran cantidad en los ganglios linfáticos, la médula ósea, el hígado, el pulmón y en un menor grado por los riñones, el cerebro y la piel. CXCR4 también se reconoce por una quimiocina antagonista, la proteína II inflamatoria de macrófagos viral (vMIP-II) codificada por el virus herpes humano de tipo III.

El eje CXCR4/SDF-1 desempeña un papel en el cáncer y está implicado directamente en la migración, la invasión que conduce a la metástasis. De hecho, las células cancerosas expresan el receptor CXCR4, migran y entran en la circulación sistémica. A continuación, las células cancerosas se detienen en lechos vasculares en órganos que producen altos niveles de SDF-1 donde proliferan, inducen angiogénesis y forman tumores metastásicos (Murphy P. M., 2001). Este eje también está implicado en la proliferación celular mediante la

activación de la ruta de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Barbero S. *et al.*, 2003) y la angiogénesis (Romagnani P., 2004). De hecho, el receptor CXCR4 y su ligando SDF-1 promueven claramente la angiogénesis estimulando la expresión de VEGF-A que, a su vez, aumenta la expresión de CXCR4/SDF-1 (Bachelder R. E. *et al.*, 2002). También es conocido que los macrófagos asociados a tumores (TAM) se acumulan en zonas hipóxicas de los tumores y se estimulan para cooperar con células tumorales y promover la angiogénesis. Se observó que la hipoxia regulaba por incremento selectivamente la expresión de CXCR4 en diversos tipos celulares incluyendo TAM (Mantovani A. *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que el eje CXCR4/SDF-1 regula el tráfico/retorno de células progenitoras/madre hematopoyéticas CXCR4+ (HSC) y podría desempeñar un papel en la neovascularización. Las pruebas indican que además de HSC, también se expresa CXCR4 funcional en las células madre de otros tejidos (células madre comprometidas por tejido = TCSC) por lo que SDF-1 puede desempeñar un papel fundamental en la quimioatracción de TCSC CXCR4+ necesaria para la regeneración de órganos/tejidos, pero estas TCSC también pueden ser un origen celular del desarrollo del cáncer (teoría de las células madre cancerosas). Se demostró un origen mediante células madres del cáncer para la leucemia humana y recientemente para varios tumores sólidos tales como de cerebro y de mama. Existen varios ejemplos de tumores de CXCR4+ que pueden derivarse de células madre específicas de tejido/órgano CXCR4+ normales tales como leucemias, tumores cerebrales, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, hepatoblastoma, cánceres de ovario y de cuello uterino (Kucia M. *et al.*, 2005).

Se demostró *in vivo* la selección como diana de metástasis cancerosas mediante interferencia con el receptor CXCR4 utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (Muller A. *et al.*, 2001). En resumen, se demostró que un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (AcM 173 R&D Systems) disminuía significativamente el número de metástasis de los ganglios linfáticos en un modelo ortotópico de cáncer de mama (MDA-MB231) en ratones SCID. Otro estudio (Phillips R. J *et al.*, 2003) también demostró el papel crítico del eje SDF-1/CXCR4 en metástasis en un modelo ortotópico de carcinoma de pulmón (A549) utilizando anticuerpos policlonales contra SDF-1, pero en este estudio no hubo efecto ni sobre el crecimiento tumoral ni sobre la angiogénesis.

Otros diversos estudios también describieron la inhibición de la metástasis *in vivo* utilizando siARN dúplex de CXCR4 (Liang Z. *et al.*, 2005) o antagonistas peptídicos de CXCR4 bioestables (Tamamura H. *et al.*, 2003) o bien del crecimiento tumoral *in vivo* utilizando antagonistas de molécula pequeña de CXCR4 como AMD 3100 (Rubin J. B. *et al.*, 2003; De Falco V. *et al.*, 2007) o AcM (patente WO2004/059285 A2). Por tanto, CXCR4 es una diana terapéutica validada para cánceres.

El receptor 2 de quimiocina (CXCR2), otro receptor de quimiocina, también se describe como una diana interesante en oncología. De hecho, CXCR2 transmite una señal de crecimiento celular autocrina en varios tipos de células tumorales y también puede afectar al crecimiento tumoral indirectamente promoviendo la angiogénesis (Tanaka T. *et al.* 2005).

El receptor de quimiocina CXCR2 engloba 360 aminoácidos. Se expresa principalmente en células endoteliales y especialmente durante la neovascularización. Varias quimiocinas se unen al receptor CXCR2: CXCL5, -6, -7, IL-8, GRO- α , - β y γ que pertenecen a las quimiocinas pro-angiogénicas ERL+. El receptor CXCR2 comparte homologías de secuencia con el receptor CXCR4: identidad de secuencia del 37% y homología de secuencia del 48%. El eje CXCR2/ligandos está implicado en varios mecanismos de crecimiento tumoral tales como metástasis (Singh R. K. *et al.*, 1994), proliferación celular (Owen J.D. *et al.*, 1997) y en la angiogénesis mediada por quimiocinas ERL+ (Strieter R. M. *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2004). Finalmente, los neutrófilos y los macrófagos asociados a tumores son elementos clave del crecimiento tumoral inducido por sustancias inflamatorias y quimiocinas tales como CXCL5, IL-8 y GRO- α inician el reclutamiento de neutrófilos.

La dimerización ha surgido como un mecanismo común para regular la función de receptores acoplados a proteínas G, estando entre ellos los receptores de quimiocina (Wang J. y Norcross M., 2008). Se ha demostrado que se requiere ^ola homo y heterodimerización en respuesta a la unión a quimiocinas para el inicio y la alteración de la señalización por varios receptores de quimiocina. Pruebas crecientes apoyan el concepto de que los dímeros u oligómeros del receptor son probablemente la unidad funcional básica de los receptores de quimiocina. Los dímeros de receptores de quimiocina se encuentran en ausencia de ligandos y las quimiocinas inducen cambios conformacionales de los dímeros de receptores. Se

sabe que CXCR4 forma homodímeros, pero también heterodímeros, por ejemplo con el receptor δ -opioide (DOR) (Hereld D., 2008) o CCR2 (Percherancier Y. *et al.*, 2005). En este último ejemplo, péptidos derivados de los dominios transmembrana de CXCR4 inhibieron la activación bloqueando las transiciones conformacionales inducidas por ligando del dímero (Percherancier Y. *et al.*, 2005). Otro estudio mostró que el péptido CXCR4-TM4, un péptido sintético de la región transmembrana de CXCR4, disminuye la transferencia de energía entre los promotores de los homodímeros de CXCR4 e inhibe la migración inducida por SDF-1 y la polimerización de actina en células malignas (Wang J. *et al.*, 2006). Más recientemente, también se describió que CXCR7 formaba heterodímeros funcionales con CXCR4 y potenciaba la señalización inducida por SDF-1 (Sierro F. *et al.*, 2007). Otros ejemplos de heterodímeros constitutivos incluyen estudios que muestran que CXCR1 y CXCR2 interaccionan así como forman homodímeros respectivos. No se observaron interacciones para cualquiera de ellos con otro GPCR (receptor adrenérgico alfa (1A)), lo que indica la especificidad de la interacción de CXCR1 y CXCR2 (Wilson S. *et al.*, 2005).

Tal como se mencionó anteriormente, los receptores CXCR4 y CXCR2 son dianas tumorales interesantes. La interferencia con esos receptores debe inhibir el crecimiento y las metástasis tumorales de una forma muy eficaz, disminuyendo la proliferación de células tumorales, la angiogénesis, la migración y la invasión de células tumorales, el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos por los tumores e inhibiendo las células madre cancerosas con CXCR4.

Uno de los aspectos inventivos de la presente invención es generar un anticuerpo monoclonal de ratón que induzca cambios conformacionales de dímeros de CXCR4. La invención engloba un AcM 414H5 frente a CXCR4 (o fragmentos del mismo) que puede unirse e inducir cambios conformacionales tanto de homodímeros de CXCR4 como de heterodímeros CXCR4/CXCR2, y que presenta fuertes actividades antitumorales tanto en xenoinjerto de ratones como en modelos de supervivencia. La invención también engloba un AcM 515H7 frente a CXCR4 (o fragmentos del mismo) que puede unirse e inducir cambios conformacionales tanto de homodímeros de CXCR4 como de heterodímeros CXCR4/CXCR2, y que presenta fuertes actividades antitumorales. El AcM 414H5 anti-CXCR4 inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 y aumenta la supervivencia de ratones en el modelo de U937. Inducen

cambios conformacionales de homodímeros de CXCR4 pero también en heterodímeros CXCR4/CXCR2. Esta nueva propiedad debe ser de interés para su aplicación en la terapia contra el cáncer dados los importantes papeles de estos dos receptores de quimiocina en el cáncer.

Ya se ha encontrado que la selección como diana tanto de homo como de heterodímeros de receptores aumenta el efecto terapéutico del AcM. De hecho, se ha demostrado, por ejemplo, que un AcM (h7C10) que seleccionaba como diana tanto IGF-1R como receptores híbridos de insulina/IGF-1 era más potente para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* que un AcM que seleccionaba como diana únicamente IGF-1R (Pandini G., 2007).

Además, los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 son antagonistas silenciosos para CXCR4, no cambian la señal basal en ensayos *in vitro* pero inhiben la señalización inducida por SDF-1 en diferentes ensayos (unión a GTP γ S, liberación de AMPc) y también pueden inhibir la proliferación y la migración *in vitro* de células tumorales inducidas por SDF-1.

Las moléculas que actúan o bien como agonistas parciales o bien como agonistas inversos muestran actividad intrínseca en ausencia de ligandos. Estos tipos de moléculas estabilizan, respectivamente, un estado de GPCR de alta afinidad o de baja afinidad, incluso en ausencia de ligando, activando o inhibiendo de ese modo cascadas de señalización posteriores (Galandin *et al.*, 2007; Kenakin, 2004).

En el caso de los AcM 414H5 y 515H7, estas moléculas se comportan como antagonistas silenciosos, sin ninguna actividad intrínseca en el receptor CXCR4 en ausencia de SDF-1. Es probable que esta característica farmacológica esté asociada con menos efectos secundarios adversos en comparación con agonistas parciales o inversos, tal como ya se observó para los ligandos de receptores opioides (Bosier y Hermans, 2007). De hecho, la actividad funcional de ambos AcM 414H5 y 515H7 es totalmente dependiente de la presencia de SDF-1 y no se observará modulación de la actividad del receptor CXCR4 en tejidos y órganos en los que el ligando SDF-1 no se expresa, secreta ni proporciona por el flujo sanguíneo. Por tanto, es probable que los AcM 414H5 y 515H7 sean menos tóxicos en comparación con otros ligandos del receptor CXCR4 con eficacia positiva o negativa. Además, los antagonistas silenciosos son las especies minoritarias en el entorno farmacológico (Wurch *et al.*, 1999, Kenakin, 2004).

Sorprendentemente, por primera vez, los inventores han podido generar anticuerpos que pueden unirse a CXCR4 pero que también pueden inducir cambios conformacionales de los homodímeros y/o heterodímeros CXCR4. Más particularmente, los anticuerpos de la invención pueden inducir cambios conformacionales de los homodímeros de CXCR4 pero también de los heterodímeros CXCR4/CXCR2.

En la siguiente memoria, la expresión plural "dímeros de CXCR4" debe entenderse que engloba los homodímeros de CXCR4 y también los heterodímeros CXCR4/CXCR2.

Debe mencionarse en este momento que tales anticuerpos nunca se han descrito en la técnica anterior. Además, debe mencionarse que nunca se ha descrito la existencia de heterodímeros CXCR4/CXCR2.

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

Por tanto, en un aspecto particular, la presente invención se refiere a un complejo aislado que comprende o que consiste en el heterodímero CXCR4/CXCR2.

Preferentemente, la parte del compuesto CXCR4 de dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2 es una de las dos isoformas de CXCR4 humanas seleccionadas del grupo que consiste en:

- la isoforma b del receptor 4 de quimiocina (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que presenta la secuencia tal como se representa con el número de registro de Genbank NP_003458 SEQ ID N° 29:

MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGNG
LVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAV
HVIYTVNLYSSVLILAFISLD RYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVGWWIPALLLTIPD
FIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIISKLSHSK
GHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEI IKQGCEFENTVHKWISITEAL
AFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESES
SSFHSS;

- la isoforma a del receptor 4 de quimiocina (motivo C-X-C) [*Homo sapiens*] que presenta la secuencia tal como se representa con el número de registro de Genbank NP_001008540 SEQ ID N° 30:

- 8 -

MSIPLPLLQIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIV
GNGLVILVMGYQKKLRSM TD KYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLC
KAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLD RYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVGWWIPALL
TIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIISKL
SHSKGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGCEFENTVHKWISI
TEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVST
ESESSSFHSS;

- una variante de corte y empalme transcripcional alternativo o una variante natural del mismo que presenta por lo menos una identidad del 95% con una de esas isoformas b o a que presenta la SEQ ID N° 29 ó 30; y
- un fragmento de la misma que puede reconocerse específicamente por su ligando natural, el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) y que presenta preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

Preferentemente, la parte del compuesto CXCR2 de dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2 se selecciona del grupo que consiste en:

- el receptor beta de la interleucina 8 [*Homo sapiens*] que presenta la secuencia tal como se representa con el número de registro de Genbank NP_001548 SEQ ID N° 31:

MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLLDAAPCEPESLEINKYFVVIYA
LVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLP IWAASKVNGWI
FGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVD RYLAIVHATRTL TQKRYLVKFICLSIWG
LSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIML
FCYGFTLRTL FKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTL MRTQVIQE
TCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSL PKD
SRPSFVGSSSGHTSTTL;

- una variante de corte y empalme transcripcional alternativo o una variante natural del mismo que presenta por lo menos una identidad del 95% con este receptor beta de la interleucina 8 que presentan la SEQ ID N° 31; y
- un fragmento de la misma que puede reconocerse específicamente por IL-8 y que presenta preferentemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

En este aspecto particular, la presente invención también comprende un ARN o ADN aislado que codifica para un polipéptido que comprende dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2.

Esta invención comprende adicionalmente un constructo nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica para dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2.

La invención comprende adicionalmente una composición que comprende por lo menos un constructo nucleico, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica para la parte CXCR4 de dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2, y un segundo constructo, preferentemente un vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica para la parte CXCR2 de dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2.

En este aspecto, la invención comprende adicionalmente un procedimiento para la preparación de una célula huésped recombinante que expresa dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2, comprendiendo este procedimiento una etapa de transformar dicha célula huésped:

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

En una forma de realización preferida, dicha célula huésped es una célula eucariota, tal como una célula de mamífero.

En una forma de realización preferida, el/los constructo(s) nucleico(s) que codifica(n) para dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2 también codifican para un primer marcador que está asociado (particularmente mediante acoplamiento covalente) con la secuencia de CXCR4, tal como el marcador luc, y para un segundo marcador que está asociado (particularmente mediante acoplamiento covalente) con la secuencia de CXCR2, tal como el marcador GFP (es decir, para el análisis de BRET).

La invención también comprende un procedimiento para seleccionar un compuesto que presenta una actividad anticancerígena o que puede utilizarse para la preparación de una composición para el tratamiento del cáncer, caracterizado porque dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto una célula huésped recombinante de la presente invención que expresa dicho complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2 con el compuesto que va a someterse a prueba; y
- b) determinar si este compuesto puede modular, preferentemente inhibir, la actividad de este complejo de heterodímero CXCR4/CXCR2 en la célula huésped recombinante.

En un primer aspecto, un objeto de la presente invención es un procedimiento para la generación y la selección de anticuerpos según la invención.

Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4, o uno de sus derivados o fragmentos funcionales, que puede inhibir la activación tanto dependiente de ligando como independiente de ligando de CXCR4, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- i) examinar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos que pueden unirse específicamente a CXCR4 y también modular la activación de CXCR4;

- ii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos que pueden inducir un cambio conformacional de los homodímeros de CXCR4, y luego

- iii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos que pueden inducir un cambio conformacional de los heterodímeros CXCR4/CXCR2.

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

Tal como se explicó anteriormente, la inducción de cambios conformacionales de los dímeros de CXCR4 es un aspecto capital de la invención, ya que dichos anticuerpos presentarán un interés real para una mayor población de pacientes.

La generación del anticuerpo puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, tal como por ejemplo, la fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados o de otras especies compatibles con las células de mieloma seleccionadas [Kohler &

Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. Los animales inmunizados podrían incluir ratones transgénicos con locus de inmunoglobulinas humanas que entonces producen directamente anticuerpos humanos. Otra posible forma de realización podría consistir en utilizar tecnologías de presentación en fagos para examinar bibliotecas.

La etapa de examen i) puede realizarse mediante cualquier método o procedimiento conocido por el experto en la materia. Como ejemplos no limitativos, pueden mencionarse ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis de FACS y exámenes funcionales. Un procedimiento preferido consiste en un examen mediante análisis de FACS en transfectante de CXCR4 y en por lo menos una línea celular tumoral para asegurarse de que los anticuerpos producidos también podrán reconocer el receptor nativo sobre las células tumorales. Este procedimiento se describirá con más precisión en los siguientes ejemplos.

Mediante la expresión "modular la activación de CXCR4" se pretende modular por lo menos una de la actividad representada en los ejemplos 4, 5, 7 y 13 a continuación:

Preferentemente modular:

- La unión específica en membranas celulares del ligando SDF-1 al receptor CXCR4 (véase el ejemplo 4), particularmente mediante competencia en membranas de células eucariotas transformadas, tales como membranas de CHO-K1, que expresan de manera estable el receptor CXCR4 de tipo natural humano;
- la unión específica en membranas celulares de GTP γ S al receptor CXCR4 (véase el ejemplo 5), particularmente en membranas de células eucariotas transformadas, tales como células NIH-3T3, que expresan de manera estable y constitutiva membranas del receptor CXCR4 de tipo natural;
- la inhibición mediada por CXCR4 de la producción de AMPc (véase el ejemplo 7); y
- la movilización mediada por el receptor CXCR4 de reservas de calcio intracelulares (véase el ejemplo 13).

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

En una forma de realización preferida de las etapas ii) y iii) de selección del procedimiento de la invención, dichas etapas ii) y iii) consisten en evaluar

anticuerpos mediante análisis de BRET en células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP, respectivamente, y seleccionar anticuerpos que pueden inhibir por lo menos el 40%, preferentemente el 45%, 50%, 55% y lo más preferentemente el 60% de la señal de BRET.

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

La tecnología de BRET, utilizada en las etapas ii) y iii) del procedimiento, la conoce bien el experto en la materia y se detallará en los siguientes ejemplos. Más particularmente, BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia) es una transferencia de energía no radiactiva que se produce entre un donador bioluminiscente (luciferasa de *Renilla* (Rluc)) y un aceptor fluorescente, un mutante de GFP (proteína fluorescente verde) o YFP (proteína fluorescente amarilla). En el presente caso, se utilizó EYFP (proteína fluorescente amarilla potenciada). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y de la distancia entre el donador y el aceptor. A continuación, la transferencia de energía sólo puede producirse si las dos moléculas están en proximidad cercana (1-10 nm). Se utiliza esta propiedad para generar ensayos de interacción proteína-proteína. De hecho, con el fin de estudiar la interacción entre dos parejas, la primera se fusiona genéticamente con la luciferasa de *Renilla* y la segunda con el mutante amarillo de la GFP. Las proteínas de fusión se expresan generalmente, pero no obligatoriamente, en células de mamífero. En presencia de su sustrato permeable en la membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante de GFP está más cerca de 10 nm de Rluc, puede producirse una transferencia de energía y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal de BRET se mide como la razón entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donador. Por tanto, la señal de BRET aumentará a medida que las dos proteínas de fusión se aproximan o si un cambio conformacional aproxima Rluc y el mutante de GFP.

Si el análisis de BRET consiste en una forma de realización preferida, puede utilizarse cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia para medir cambios conformacionales de los dímeros de CXCR4. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), HTRF (fluorescencia resuelta con tiempo

homogéneo), FLIM (microscopía de obtención de imágenes de toda la duración de la fluorescencia) o SW-FCCS (espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia de longitud de onda única).

También podrían utilizarse otras tecnologías clásicas, tales como co-inmunoprecipitación, examen alfa, reticulación química, doble híbrido, cromatografía de afinidad, ELISA o inmunotransferencia de tipo Far-Western.

En un aspecto particular del procedimiento según la invención, la etapa ii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis de BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y seleccionar anticuerpos que pueden inhibir por lo menos el 40% de la señal de BRET.

En otro aspecto particular del procedimiento según la invención, la etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis de BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP y seleccionar anticuerpos que pueden inhibir por lo menos el 40% de la señal de BRET.

En un segundo aspecto, un objetivo de la invención es proporcionar un anticuerpo aislado, o uno de sus derivados o fragmentos funcionales, que se obtiene mediante dicho procedimiento. Dicho anticuerpo o uno de sus dichos derivados o fragmentos puede unirse específicamente al CXCR4 humano y, si es necesario, preferentemente además puede inhibir la unión natural de su ligando, pudiendo también dicho anticuerpo inducir cambios conformacionales de los dímeros de CXCR4.

Las expresiones "derivados y fragmentos funcionales" se definirán en detalle a continuación en la presente memoria.

Debe entenderse en la presente memoria que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su entorno natural sino que se han podido aislar u obtenerse mediante purificación a partir de fuentes naturales, o también han podido obtenerse mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y entonces pueden contener aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante.

Más particularmente, según otro aspecto de la invención, se reivindica un anticuerpo, o uno de sus derivados o fragmentos funcionales, estando caracterizado dicho anticuerpo porque comprende por lo menos una región determinante de complementariedad, CDR, seleccionada de CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID N^{os} 1 a 12.

Más particularmente, según otro aspecto de la invención, se reivindica un anticuerpo, o uno de sus derivados o fragmentos funcionales, estando caracterizado dicho anticuerpo porque comprende por lo menos una región determinante de complementariedad, CDR, escogida de CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID N^{os} 2, 5 ó 40 a 49.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de secuencias SEQ ID N^{os} 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de secuencias SEQ ID N^{os} 40, 2, 41, 42, 5 ó 43 o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 40, 2, 41, 42, 5 ó 43.

Un "fragmento funcional" de un anticuerpo significa en particular un fragmento de anticuerpo, tal como los fragmentos Fv, scFv (sc = cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida se ha aumentado. Dichos fragmentos funcionales se describirán en detalle más adelante en la presente descripción.

Un "compuesto derivado" o "derivado" de un anticuerpo significa en particular una proteína de unión compuesta por un armazón peptídico y por lo menos una de las CDR del anticuerpo original con el fin de conservar su capacidad para reconocer CXCR4. Dichos compuestos derivados, bien conocidos por un experto en la materia, se describirán en más detalle más adelante en la presente descripción.

Más preferentemente, la invención comprende los anticuerpos, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, según la presente invención, en particular quiméricos o humanizados, obtenidos mediante recombinación genética o síntesis química.

Según una forma de realización preferida, el anticuerpo según la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado porque consiste en un anticuerpo monoclonal.

La expresión "Anticuerpo monoclonal" se entiende que significa un anticuerpo que surge a partir de una población de anticuerpos casi homogénea. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos excepto por unas pocas posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que surge a partir del crecimiento de un único clon celular (por ejemplo un hibridoma, una célula huésped eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica para el anticuerpo homogéneo, una célula huésped procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica para el anticuerpo homogéneo, etc.) y generalmente se caracteriza por cadenas pesadas de una y sólo una clase y subclase, y cadenas ligeras de sólo un tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítomo del antígeno.

Debe entenderse en la presente memoria que la invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir, no se toman de su entorno natural sino que se aíslan o se obtienen mediante purificación a partir de fuentes naturales o se obtienen mediante recombinación genética o síntesis química y, por tanto, pueden portar aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante.

Más particularmente, según una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID N° 1, 2 ó 3, o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N° 1, 2 ó 3; o comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°s 4, 5 ó 6, o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo

menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 4, 5 ó 6.

Según otra forma de realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEQ ID N^o 1, 2 ó 3, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 1, 2 ó 3.

De una manera preferida, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en las que:

- CDR-L1 comprende la secuencia SEQ ID N^o 1 ó 9, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 1 ó 9;
- CDR-L2 comprende las secuencias SEQ ID N^o 2 ó 10, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 2 ó 10; y
- CDR-L3 comprende la secuencia SEQ ID N^o 3, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 3.

Según una forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N^o 1, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N^o 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N^o 3.

Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N^o 9, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N^o 10 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N^o 3.

Más particularmente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos una de las tres

CDR de las secuencias SEQ ID N^{os} 4, 5 ó 6, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 4, 5 ó 6.

Incluso más preferentemente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en las que:

- CDR-H1 comprende las secuencias SEQ ID N^{os} 4, 7 u 11, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 4, 7 u 11;
- CDR-H2 comprende las secuencias SEQ ID N^{os} 5 ó 12, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 5 ó 12; y
- CDR-H3 comprende las secuencias SEQ ID N^o 6 u 8, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 6 u 8.

Según una forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N^o 7, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N^o 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N^o 8.

Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N^o 11, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N^o 12 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N^o 6.

Más particularmente, según una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR escogida entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID N^{os} 40, 2 ó 41 o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^o 40, 2 ó 41; o comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR escogida entre las CDR de las

secuencias de aminoácidos SEQ ID N^{os} 42, 5 ó 43, o por lo menos una CDR cuya secuencia presenta una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 42, 5 ó 43.

Según otra forma de realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados porque comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEQ ID N^{os} 40, 2 ó 41, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 40, 2 ó 41.

De una manera preferida, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en las que:

- CDR-L1 comprende la secuencia SEQ ID N^o 40 ó 46, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 40 ó 46;
- CDR-L2 comprende las secuencias SEQ ID N^o 2 ó 47, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 2 ó 47; y
- CDR-L3 comprende la secuencia SEQ ID N^o 41, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No 41.

Según una forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N^o 40, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N^o 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N^o 41.

Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N^o 46, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N^o 47 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N^o 41.

Más particularmente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados porque comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos una de las tres CDR de las secuencias SEQ ID N^{os} 42, 5 ó 43, o por lo menos una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 42, 5 ó 43.

Incluso más preferentemente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en las que:

- CDR-H1 comprende las secuencias SEQ ID N^{os} 42, 44 ó 48, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 42, 44 ó 48;
- CDR-H2 comprende las secuencias SEQ ID N^o 5 ó 49, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 5 ó 49; y
- CDR-H3 comprende las secuencias SEQ ID N^o 45 ó 43, o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 45 ó 43.

Según una forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados porque comprenden una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N^o 44, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N^o 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N^o 45.

Según otra forma de realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, están caracterizados porque comprenden una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N^o 48, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N^o 49 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N^o 43.

En la presente descripción, las expresiones "polipéptidos", "secuencias polipeptídicas", "péptidos" y "proteínas unidas a compuestos de anticuerpo o a sus secuencias" son intercambiables.

Debe entenderse en la presente memoria que la invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir, no se obtienen de su entorno natural sino

que se aíslan o se obtienen mediante purificación a partir de fuentes naturales o se obtienen mediante recombinación genética o síntesis química y, por tanto, pueden portar aminoácidos no naturales tal como se describirá a continuación.

En una primera forma de realización, región determinante de complementariedad, o CDR, significa las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas tal como definen Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5ª Ed., U.S. Department of Health y Human Services, NIH, 1991, y ediciones posteriores). Hay tres CDR en la cadena pesada y tres CDR en la cadena ligera. En este caso, el término "CDR" se utiliza para indicar, dependiendo del caso, una o más, o incluso todas, las regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

En una segunda forma de realización, por regiones CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas tal como se define mediante el IMGT.

La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables independientemente del receptor antigénico, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1ª-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2ª-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación normalizada de las regiones de entramado (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Dado que los huecos representan posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, denominadas IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-

DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

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

Para más claridad, debe entenderse que en la siguiente descripción, y más particularmente en las tablas 2 y 3, las CDR se definirán mediante la numeración de IMGT, la numeración de Kabat y mediante numeración común.

La numeración común reagrupa los residuos parte de cada CDR que son comunes a las CDR tal como se define por los sistemas de numeración de IMGT y Kabat.

El sistema de numeración de IMGT define las CDR según el sistema de IMGT tal como se definió anteriormente, mientras que el sistema de numeración de Kabat define las CDR según el sistema de Kabat, tal como se definió anteriormente.

Más particularmente, CDR-L1 consiste en la SEQ ID N° 1 (**QSLYNSRTRKNY**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 9 (**KSSQSLYNSRTRKNYLA**) en el sistema de numeración de Kabat.

Con respecto a la CDR-L2, consiste en la SEQ ID N° 2 (**WAS**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 10 (**WASTRES**) en el sistema de numeración de Kabat.

La CDR-L3 consiste en la SEQ ID N° 3 (**KQSYNLRT**) para cada uno de los tres sistemas de numeración.

Para la cadena pesada, la CDR-H1 consiste en la SEQ ID N° 4 (**TDYY**) en el sistema de numeración común, en la SEQ ID N° 7 (**GFTFTDYY**) en el sistema de numeración de IMGT y en la SEQ ID N° 11 (**TDYYMS**) en el sistema de numeración de Kabat.

La CDR-H2 consiste en la SEQ ID N° 5 (**IRNKANGYTT**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 12 (**FIRNKANGYTTEYSASVKG**) en el sistema de numeración de Kabat.

Finalmente, la CDR-H3 consiste en la SEQ ID N° 6 (**DIPGFAY**) en los sistemas de numeración común y de Kabat, mientras que consiste en la SEQ ID N° 8 (**ARDIPGFAY**) en el sistema de numeración de IMGT.

Más particularmente, CDR-L1 consiste en la SEQ ID N° 40 (**QSLFNSRTRKNY**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 46 (**KSSQSLFNSRTRKNYLA**) en el sistema de numeración de Kabat.

Con respecto a la CDR-L2, consiste en la SEQ ID N° 2 (**WAS**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 47 (**WASARDS**) en el sistema de numeración de Kabat.

La CDR-L3 consiste en la SEQ ID N° 41 (**MQSFNLRT**) para cada uno de los tres sistemas de numeración.

Para la cadena pesada, la CDR-H1 consiste en la SEQ ID N° 42 (**DNY**) en el sistema de numeración común, en la SEQ ID N° 44 (**GFTFTDNY**) en el sistema de numeración de IMGT y en la SEQ ID N° 48 (**DNYMS**) en el sistema de numeración de Kabat.

La CDR-H2 consiste en la SEQ ID N° 5 (**IRNKANGYTT**) en los sistemas de numeración común y de IMGT y en la SEQ ID N° 49 (**FIRNKANGYTTDYSASVRG**) en el sistema de numeración de Kabat.

Finalmente, la CDR-H3 consiste en la SEQ ID N° 43 (**DVGSNYFDY**) en los sistemas de numeración común y de Kabat, mientras que consiste en la SEQ ID N° 45 (**ARDVGSNYFDY**) en el sistema de numeración de IMGT.

En el sentido de la presente invención, la "identidad en porcentaje" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de residuos de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que van a compararse, obtenido tras la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de las dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias una vez que se han alineado óptimamente, pudiendo realizarse dicha comparación por segmentos o utilizando una "ventana de alineación". Puede llevarse a cabo la alineación óptima de las secuencias para la comparación, además de la comparación a mano, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio

del procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o por medio de software informático utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante el software de comparación BLAST NR o BLAST P).

La identidad en porcentaje entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se determina comparando las dos secuencias óptimamente alineadas en las que la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos para comparar puede presentar adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia para la alineación óptima entre las dos secuencias. La identidad en porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que el residuo de aminoácido o nucleótido es idéntico entre las dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas entre el número total de posiciones en la ventana de alineación y multiplicando el resultado por 100 para obtener la identidad en porcentaje entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, puede utilizarse con los parámetros por defecto (en particular para los parámetros "penalización por hueco abierto": 5, y "penalización por hueco de extensión": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); la identidad en porcentaje entre las dos secuencias para comparar se calcula directamente por el programa.

Para la secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen los que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una deleción, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplacen por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácidos equivalentes" pretende indicar cualquier aminoácido que es probable

que se sustituya por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes ni las de los ejemplos específicos definidos más adelante.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse o bien basándose en su homología estructural con los aminoácidos por los que se sustituyen o bien basándose en los resultados de pruebas comparativas de la actividad biológica entre los diversos anticuerpos que es probable que se generen.

A título de ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las posibles sustituciones que es probable que se lleven a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente; naturalmente son posibles sustituciones inversas en las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo original	Sustitución/sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Los expertos en la materia conocen que en el estado actual de la técnica la mayor variabilidad (longitud y composición) entre las seis CDR se encuentra en las tres CDR de la cadena pesada y, más particularmente, en CDR-H3 de esta cadena pesada. En consecuencia, resultará evidente que las CDR características preferidas de los anticuerpos de la invención, o de uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, serán las tres CDR de la cadena pesada, es decir, para el 414H5 las CDR codificadas por las secuencias SEQ ID N^{os} 7, 5, 8 y 11, 12, 6, respectivamente, definidas según IMGT y Kabat y, para el 515H7, las CDR codificadas por las secuencias SEQ ID N^{os} 44, 5, 45 y 48, 49, 43, respectivamente, definidas según IMGT y Kabat. Incluso más preferentemente, la CDR correspondiente a la CDR-H3 codificada por la secuencia SEQ ID N^o 8 ó 6 para el 414H5 y 45 ó 43 para el 515H7.

En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a un anticuerpo murino, o compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo.

Otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N^o 1 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 1;

CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N^o 2 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 2; y

CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N^o 3 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 3, y

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N^o 4 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 4;

CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N^o 5 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N^o 5; y

CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 6 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 6.

Todavía otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 1 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 1;
- CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 2; y
- CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 3 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 3, y una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 7 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 7;
- CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 5; y
- CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 8 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 8.

Todavía otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 9 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 9;
 - CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 10 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 10; y
 - CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 3 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 3, y una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:
- CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 11 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 11;
 - CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 12 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 12; y

- CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 6 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 6.

Un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención se caracteriza porque comprende:

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 1, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 3; y

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 7, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 8.

En otra forma de realización, un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención se caracteriza porque comprende:

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 9, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 10 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 3; y

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 11, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 12 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 6.

Según todavía otra forma de realización, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 13 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 13; y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 14 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 14.

Otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 40 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 40;

CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 2; y

CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 41, y

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 42 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 42;

CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 5; y

CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 43 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 43.

Todavía otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 40 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 40;

- CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 2; y

- CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 41, y

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 44 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 44;

- CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 5; y

- CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 45 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 45.

Todavía otra forma de realización de la invención da a conocer un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 46 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 46;
- CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 47 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 47; y
- CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 41, y una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

- CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 48 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 48;
- CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 49 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 49; y
- CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 43 o de una secuencia con una identidad de por lo menos el 80% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 43.

Un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención está caracterizado porque comprende:

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 40, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41; y

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 44, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 45.

En otra forma de realización, un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención se caracteriza porque comprende:

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 46, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 47 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41; y

- una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 48, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 49 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 43.

Según todavía otra forma de realización, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 50 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 50; y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 51 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 51.

Tal como se observó anteriormente, la invención también se refiere a cualquier compuesto derivado de un anticuerpo tal como se describe en la invención.

Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está caracterizado porque dicho compuesto derivado consiste en una proteína de unión que comprende un armazón peptídico en el que se injerta por lo menos una CDR de una forma tal que se conservan todas o parte de las propiedades de reconocimiento del parátipo del anticuerpo inicial.

También pueden estar presentes una o más secuencias entre las seis secuencias de CDR descritas en la presente invención en los diversos armazones proteicos de la inmunoglobulina. En este caso, la secuencia de la proteína posibilita recrear un esqueleto peptídico favorable para el plegamiento de las CDR injertadas, permitiéndoles conservar sus propiedades de reconocimiento del antígeno por el parátipo.

Generalmente, un experto en la materia conoce cómo determinar el tipo de armazón proteico en el que injertar por lo menos una de las CDR que surgen a partir del anticuerpo original. Más particularmente, se conoce que, para que se seleccionen, dichos armazones deben cumplir el mayor número de criterios, tal como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187):

- buena conservación filogenética;
- estructura tridimensional conocida (como, por ejemplo, mediante cristalografía, espectroscopía de RMN o cualquier otra técnica conocida por un experto en la materia);
- tamaño pequeño;

- pocas o ninguna modificación postranscripcional; y/o
- fácil de producir, expresar y purificar.

El origen de dichos armazones proteicos pueden ser, pero sin limitarse a, las estructuras seleccionadas entre: fibronectina y preferentemente el dominio 10 de la fibronectina tipo III, lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), proteína Z que surge del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición anquirina" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, N.º 4, 1700-1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido".

También deben mencionarse los armazones derivados de toxinas tales como, por ejemplo, toxinas de escorpiones, insectos, plantas, moluscos, etc., y los inhibidores proteicos de la NO sintasa neuronal (PIN).

Un ejemplo, en modo alguno limitativo, de construcciones híbridas de este tipo, es la inserción de la CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, concretamente 13B8.2, en uno de los bucles en el PIN, conservando la nueva proteína de unión así obtenida las mismas propiedades de unión que el anticuerpo original (Bes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). Partiendo de una base meramente ilustrativa, también pueden mencionarse el injerto de la CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-VHH de lisozima en uno de los bucles de neocarzinostatina (Nicaise *et al.*, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

Finalmente, tal como se describió anteriormente, dichos armazones peptídicos pueden comprender desde una hasta seis CDR que provienen del anticuerpo original. Preferentemente, pero no es un requisito, un experto en la materia seleccionará por lo menos una CDR de la cadena pesada, conociéndose que esta última es responsable principalmente de la especificidad del anticuerpo. La selección de una o más CDR relevantes resulta evidente para un experto en la materia, que elegirá técnicas conocidas adecuadas (Bes *et al.*, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Un aspecto específico de la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un compuesto derivado de un anticuerpo según la invención, pudiendo inhibir dicho compuesto derivado, *in vitro* y/o *in vivo*, el crecimiento de células tumorales y comprendiendo dicho compuesto derivado un

armazón peptídico en el que se injerta por lo menos una CDR de anticuerpo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto *in vitro* un compuesto que se compone de un armazón peptídico en el que se injerta por lo menos una CDR de anticuerpo con una muestra biológica que contiene células tumorales que pueden crecer y en condiciones que permiten que crezcan estas células; y

b) seleccionar dicho compuesto si dicho compuesto puede inhibir el crecimiento de estas células tumorales,

y caracterizado porque dicha por lo menos una CDR injertada se selecciona entre las siguientes CDR:

- la CDR de secuencia SEQ ID N° 1, 9, 40, 46 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 1, 9, 40, 46;
- la CDR de secuencia SEQ ID N° 2, 10, 47 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 2, 10, 47;
- la CDR de secuencia SEQ ID N° 3, 41 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 3, 41;
- la CDR de secuencia SEQ ID N° 4, 7, 11, 42, 44, 48 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 4, 7, 11, 42, 44, 48;
- la CDR de secuencia SEQ ID N° 5, 12, 49 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 5, 12, 49; y
- la CDR de secuencia SEQ ID N° 6, 8, 43, 45 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con la secuencia SEQ ID N° 6, 8, 43, 45.

Según un modo preferido, el procedimiento puede incluir en la etapa a) poner en contacto *in vitro* un compuesto que comprende un armazón peptídico en el que se injertan por lo menos dos o tres CDR de anticuerpo.

Según un modo aún más preferido de este procedimiento, el armazón peptídico se selecciona entre los armazones o proteínas de unión cuyas estructuras se mencionaron anteriormente.

Obviamente, estos ejemplos no son limitativos en modo alguno, y debe considerarse que cualquier otra estructura que conozca o sea obvia para un experto en la materia está comprendida en la protección conferida por la presente solicitud de patente.

Por tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque el armazón peptídico se selecciona entre proteínas que a) se conservan bien filogenéticamente, b) son de arquitectura robusta, c) con una organización molecular 3D bien conocida, d) de pequeño tamaño y/o e) que comprenden regiones que pueden modificarse mediante delección y/o inserción sin modificar las propiedades de estabilidad.

Según una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque dicho armazón peptídico se selecciona entre i) armazones que provienen de fibronectina, preferentemente dominio 10 de fibronectina tipo 3, lipocalina, anticalina, proteína Z que proviene del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tales como la "repetición anquirina" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700–1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido" o iii) inhibidores proteicos de la NO sintasa neuronal (PIN).

Otro aspecto de la invención se refiere a los fragmentos funcionales del anticuerpo descrito anteriormente.

Más particularmente, la invención presenta como objetivo un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida haya aumentado tal como los fragmentos pegilados.

Dichos fragmentos funcionales del anticuerpo según la invención consisten, por ejemplo, en los fragmentos Fv, scFv (sc=*simple chain*, cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida haya aumentado mediante modificación química, tal como la adición de polialquilenglicol

tal como polietilenglicol (pegilación) (los fragmentos pegilados se denominan Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o mediante su incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, presentando dichos fragmentos por lo menos una de las CDR características de la invención que puede ejercer en particular de manera general una actividad, incluso parcial, del anticuerpo del que proviene.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales comprenderán o incluirán a una secuencia parcial de de la cadena ligera o pesada variable del anticuerpo del que se derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del que proviene y suficiente afinidad, preferentemente por lo menos igual a 1/100, más preferentemente por lo menos 1/10 de la del anticuerpo del que proviene.

Un fragmento funcional de este tipo contendrá por lo menos cinco aminoácidos, preferentemente 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 ó 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del que proviene.

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

Para mayor claridad, la tabla 2 a continuación resume las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes al anticuerpo de la invención.

Tabla 2 (en la que mu. = murino y qui. = quimérico)

Anticuerpo	Numeración de CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID N°
414H5	Común		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		7
		CDR-H2		5
		CDR-H3		8
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		6
			Dominio variable mu.	13
		Dominio variable mu.		14
			Dominio variable qui.	64
		Dominio variable qui.		65
515H7	Común		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		42
		CDR-H2		5
		CDR-H3		43
	IMGT		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		44
		CDR-H2		5

		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	46
			CDR-L2	47
			CDR-L3	41
		CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		43
			Dominio variable mu.	50
		Dominio variable mu.		51
			Dominio variable qui.	66
		Dominio variable qui.		67

Otro aspecto específico de la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo también comprende regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón, en particular el ser humano.

Todavía otro aspecto específico de la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivadas de anticuerpo humano son, respectivamente, la región lambda o kappa y la región gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino que puede secretar un anticuerpo monoclonal según la invención, en particular el hibridoma de origen murino presentado ante la colección francesa de cultivos de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur, París, Francia) el 22 de octubre de 2007, con el número I-3860. Se obtuvo dicho hibridoma mediante la fusión de esplenocitos de ratón inmunizado Balb/C y células de las líneas de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

El anticuerpo monoclonal, denominado 414H5 en la presente memoria, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo se secreta por el hibridoma presentado ante el CNCM el 22 de octubre de 2007, con el número I-3860, obviamente forma parte de la presente invención.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino que puede secretar un anticuerpo monoclonal según la invención, en particular el

hibridoma de origen murino presentado ante la colección francesa de cultivos de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur, París, Francia) el 25 de junio de 2008, con el número I-4019. Se obtuvo dicho hibridoma mediante la fusión de esplenocitos de ratón inmunizado Balb/C y células de las líneas de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

El anticuerpo monoclonal, denominado 515H7 en la presente memoria, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo se secreta por el hibridoma presentado ante el CNCM el 25 de junio de 2008, con el número I-4019, obviamente forma parte de la presente invención.

El anticuerpo de la invención también comprende anticuerpos quiméricos o humanizados.

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

Los anticuerpos, o fragmentos quiméricos de los mismos, pueden prepararse utilizando las técnicas de genética recombinante. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede producirse mediante la clonación de ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica para la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano de la invención, en particular murino, y una secuencia que codifica para la región constante del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico según la invención codificado por un gen recombinante de este tipo puede ser, por ejemplo, una quimera de ratón-ser humano, estando determinada la especificidad de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Véase Verhoeven *et al.* (BioEssays, 8:74, 1988) para los procedimientos para preparar anticuerpos quiméricos.

En otro aspecto, la invención describe un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que consiste en un anticuerpo quimérico.

En una forma de realización preferida particular, el anticuerpo quimérico, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de la invención comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos SEQ ID N° 64, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 65.

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo quimérico, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de la invención comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 66, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 67.

La expresión "Anticuerpos humanizados" significa un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, derivándose las otras partes de la molécula del anticuerpo de un (o de varios) anticuerpo(s) humano(s). Además, pueden modificarse algunos de los residuos del segmento del esqueleto (denominado FR) para conservar la afinidad de unión (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327, 1988).

Pueden prepararse los anticuerpos humanizados de la invención o fragmentos de los mismos mediante técnicas conocidas por un experto en la materia (tales como, por ejemplo, las descritas en los documentos de Singer *et al.*, J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; y Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Se prefieren anticuerpos humanizados de este tipo para su utilización en procedimientos que implican diagnósticos *in vitro* o tratamiento preventivo y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de humanización, también conocidas por un experto en la materia, tales como, por ejemplo, la técnica de "injerto de CDR" las describe PDL en las patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US n° 5.530.101, US n° 6.180.370, US n° 5.585.089 y US n° 5.693.761. También pueden citarse las patentes US n° 5.639.641 o n° 6.054.297, n° 5.886.152 y n° 5.877.293.

Además, la invención también se refiere a anticuerpos humanizados que provienen de los anticuerpos murinos descritos anteriormente.

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

En la forma de realización correspondiente al isotipo IgG1, una característica adicional del anticuerpo es que muestra funciones efectoras, tales

como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

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

- un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o para un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la invención;

- un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico tal como se define en a);

- un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar en condiciones altamente rigurosas con por lo menos una de las CDR de las secuencias de ácido nucleico SEQ ID N^{os} 15 a 26 o SEQ ID N^{os} 52 a 61 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 15 a 26 o SEQ ID N^{os} 52 a 61; y

- un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar en condiciones altamente rigurosas con por lo menos la cadena ligera de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N^o 27 o SEQ ID N^o 62 o SEQ ID N^o 68 ó 70 y/o la cadena pesada de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N^o 28 o SEQ ID N^o 63 o SEQ ID N^o 69 ó 71 o una secuencia con una identidad de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98% tras una alineación óptima con las secuencias SEQ ID N^{os} 27 y/o 28 o SEQ ID N^{os} 62 y/o 63 o SEQ ID N^{os} 68 y/o 69 o SEQ ID N^{os} 70 y/o 71.

La tabla 3 a continuación resume las diversas secuencias de nucleótidos referentes al anticuerpo de la invención.

Tabla 3

Anticuerpo	Numeración de CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID N°
414H5	Común		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		21
		CDR-H2		19
		CDR-H3		22
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	17
		CDR-H1		25
		CDR-H2		26
		CDR-H3		20
			Dominio variable mu.	27
		Dominio variable mu.		28
			Dominio variable qui.	68
		Dominio variable qui.		69
515H7	Común		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		54
		CDR-H2		19
		CDR-H3		55
	IMGT		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		56
		CDR-H2		19

	Kabat	CDR-H3		57
			CDR-L1	58
			CDR-L2	59
			CDR-L3	53
		CDR-H1		60
		CDR-H2		61
		CDR-H3		55
			Dominio variable mu.	62
		Dominio variable mu.		63
			Dominio variable qui.	70
		Dominio variable qui.		71

Las expresiones “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de nucleótidos”, utilizadas de manera intercambiable en la presente descripción, significan una secuencia de nucleótidos precisa, modificada o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es o bien un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o bien los productos de transcripción de dichos ADN.

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

“Las secuencias nucleicas que muestran una identidad en porcentaje de por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, 90%, 95% y 98%, tras una alineación óptima con una secuencia preferida” significa secuencias nucleicas que muestran, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, en particular, una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión quimérica y/o una sustitución, en particular puntual. Preferentemente, éstas son secuencias que codifican para las mismas secuencias de aminoácidos que la secuencia de referencia, estando ésta relacionada con la degeneración del código

genético, o secuencias de complementariedad que es probable que hibriden específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente en condiciones altamente rigurosas, en particular las definidas a continuación.

La hibridación en condiciones altamente rigurosas significa que se seleccionan condiciones relacionadas con la temperatura y fuerza iónica de tal manera que permiten que se mantenga la hibridación entre dos fragmentos de ADN de complementariedad. Partiendo de una base meramente ilustrativa, las condiciones altamente rigurosas de la etapa de hibridación con el fin de definir los fragmentos de polinucleótido descrito anteriormente son ventajosamente tal como sigue.

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

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

En particular, la invención presenta como objetivo vectores de expresión y/o clonación que contienen una secuencia de nucleótidos de este tipo.

Los vectores de la invención contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias de nucleótidos en una célula huésped dada. El vector debe contener, por tanto, un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como regiones de regulación de la transcripción adecuadas. Debe poder mantenerse de manera estable en la célula

huésped y puede presentar opcionalmente señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos los selecciona y optimiza un experto en la materia según la célula huésped utilizada. Para este fin, pueden insertarse las secuencias de nucleótidos en vectores autorreplicativos dentro del huésped elegido o pueden ser vectores de integración del huésped elegido.

Se preparan vectores de este tipo mediante procedimientos utilizados normalmente por un experto en la materia y pueden introducirse los clones resultantes en un huésped adecuado mediante procedimientos convencionales tales como procedimientos de lipofección, electroporación, choque térmico o químicos.

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

La invención también comprende células huésped transformadas mediante, o que comprenden, un vector tal como se describe en la presente invención.

La célula huésped puede seleccionarse de entre sistemas procariotas o eucariotas tales como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de levadura o células animales, en particular células de mamífero. También pueden utilizarse células vegetales o de insecto.

La invención también se refiere a animales, distintos del ser humano, que presentan una célula transformada según la invención.

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

a) cultivar en un medio y en las condiciones de cultivo adecuadas para una célula huésped según la invención; y

b) recuperar dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos así a partir del medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.

Las células transformadas según la invención se pueden utilizar en procedimientos para la preparación de polipéptidos recombinantes según la invención. También están comprendidos en la presente invención procedimientos para la preparación de un polipéptido según la invención en forma recombinante,

caracterizados porque dichos procedimientos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector según la invención. Preferentemente, una célula transformada por un vector según la invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido mencionado anteriormente y la recuperación de dicho péptido recombinante.

Como ya se mencionó, la célula huésped puede seleccionarse entre sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótidos de la invención que facilitan la secreción en un sistema procariota o eucariota de este tipo. Por tanto, puede utilizarse ventajosamente un vector según la invención que lleva una secuencia de este tipo para la producción de proteínas recombinantes que han de secretarse. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés estará facilitada por el hecho de que estén presentes en el sobrenadante del cultivo celular en lugar de en el interior de las células huésped.

Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse mediante síntesis química. Un procedimiento de preparación de este tipo también es un objeto de la invención. Un experto en la materia conoce procedimientos para la síntesis química, tales como técnicas en fase sólida (véanse en particular Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ª ed.) o técnicas en fase sólida parcial, mediante condensación de fragmentos o mediante síntesis en disolución convencional. También están comprendidos en la invención los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y que pueden contener aminoácidos no naturales correspondientes. También están comprendidos en la presente invención los anticuerpos, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, que es probable que se obtengan mediante el procedimiento de la invención.

Todavía según otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo tal como se describió anteriormente, caracterizado porque, además, puede unirse específicamente a un receptor de la familia de las quimiocinas humanas y/o puede inhibir específicamente la señalización de un receptor de este tipo. Según una forma de realización novedosa, la invención se refiere a un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que consiste en un anticuerpo que es biespecífico en el sentido de que comprende un segundo motivo que puede interaccionar con cualquier receptor implicado en el desarrollo

de tumores, tales como, por ejemplo, VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, tetraspaninas, integrinas, CXCR4 (distinto al anticuerpo de la presente invención, es decir que selecciona como diana otro epítipo), CXCR7 o CXCR2.

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

Estos anticuerpos biespecíficos pueden construirse como IgG completa, Fab'2 biespecífico, Fab'PEG, diacuerpos o scFv biespecífico, pero también como anticuerpo biespecífico tetravalente en el que están presentes dos sitios de unión para cada antígeno seleccionado como diana (Park *et al.*, 2000, *Mol. Immunol.*, 37(18):1123-30) o los fragmentos del mismo tal como se describió anteriormente.

Además de una ventaja económica dado que la producción y administración de un anticuerpo biespecífico son más económicas que la producción de dos anticuerpos específicos, la utilización de tales anticuerpos biespecíficos presenta la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. En efecto, la utilización de un anticuerpo biespecífico hace posible disminuir la cantidad global de anticuerpos circulantes y, en consecuencia, la posible toxicidad.

En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo bivalente o tetravalente.

Finalmente, la presente invención se refiere al anticuerpo descrito anteriormente, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, para su utilización como un fármaco.

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

La invención también se refiere a una composición caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para su utilización de una forma simultánea, separada o extendida, un anticuerpo antitumoral distinto de un anticuerpo dirigido frente a CXCR4.

Todavía según otra forma de realización, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica tal como se describió anteriormente que comprende por lo menos un segundo compuesto antitumoral seleccionado de entre los compuestos que pueden inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de receptores tales como IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR o VEGF, o cualquier otro compuesto antitumoral conocido por un experto en la materia.

En un segundo aspecto preferido de la invención, dicho segundo compuesto puede seleccionarse entre los anticuerpos anti-EGFR, anti-IGF-IR, anti-HER2/neu, anti-cMET, VEGFR, VEGF, etc., aislados, o sus fragmentos funcionales y compuestos derivados, que pueden inhibir la actividad proliferativa y/o anti-apoptótica y/o angiogénica y/o inductiva de diseminación metastásica promovida por dichos receptores.

También son adecuados para su mención los anticuerpos anti-CD20 tales como rituximab, ibritumomab o tositumomab; anticuerpos anti-CD33 tales como gemtuzumab o lintuzumab; anticuerpos anti-CD22 tales como epratuzumab; anticuerpos anti-CD52 tales como alemtuzumab; anticuerpos anti-EpCAM tales como edrecolomab, Ch 17-1A o IGN-101; anticuerpos anti-CTP21 ó 16 tales como Xactin; anticuerpos anti-ADN-Ag tales como ¹³¹I-Cotara TNT-1; anticuerpos anti-MUC1 tales como pemtumomab o R1150; anticuerpos anti-MUC18 tales como ABX-MA1; anticuerpos anti-GD3 tales como mitumomab; anticuerpos anti-ECA tales como CeaVac o labetuzumab; anticuerpos anti-CA125 tales como OvaRex; anticuerpos anti-HLA-DR tales como apolizumab; anticuerpos anti-CTLA4 tales como MDX-010; anticuerpos anti-PSMA tales como MDX-070, ¹¹¹In y ⁹⁰Y-J591, ¹⁷⁷Lu J591, J591-DM1; anticuerpos anti-Lewis Y tales como IGN311; anticuerpos

anti-angiogénesis tales como AS1405 y 90YmuBC1; anticuerpos anti-Trail-R1 tales como AcM frente a TRAIL R1 o AcM frente a TRAIL R2.

Otra forma de realización complementaria a la invención consiste en una composición tal como se describió anteriormente que está compuesta por, además, como combinación o producto de conjugación para su utilización simultánea, separada o extendida, un agente citotóxico/citostático.

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

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

La expresión "Utilización extendida" significa la administración sucesiva de ambos compuestos de la composición, cada uno comprendido en una forma farmacéutica distinta.

Generalmente, la composición según la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento contra el cáncer. Dicho de otro modo, se potencia el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención de manera inesperada mediante la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsiguiente importante producida mediante una composición de la invención se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces menores del principio activo, haciendo así posible evitar o reducir los riesgos de aparición de efectos secundarios, en particular el efecto del agente citotóxico. Además, esta composición posibilita obtener el efecto terapéutico esperado más rápidamente.

La expresión "Agente anticancerígeno terapéutico" o "agente citotóxico" significa una sustancia que, cuando se administra a un paciente, trata o previene el desarrollo del cáncer en el paciente. Los ejemplos no limitativos de agentes de este tipo incluyen agentes "alquilantes", antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores del funcionamiento de la cromatina, antiangiogénicos, antiestrógenos, antiandrógenos e inmunomoduladores.

Se citan agentes de este tipo, por ejemplo, en VIDAL, en la página dedicada a compuestos relacionados con la oncología y hematología bajo el encabezamiento "Citotóxico"; los compuestos citotóxicos citados mediante referencia en este documento se citan en la presente memoria como agentes citotóxicos preferidos.

La expresión "Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia que puede unirse covalentemente con o que puede alquilar cualquier molécula, preferentemente un ácido nucleico (por ejemplo, ADN), dentro de una célula. Los ejemplos de agentes alquilantes de este tipo incluyen mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina, clorambucilo, melfalán, clorhidrato, pipobromán, prednimustina, fosfato de disodio o estramustina; oxazafosforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida o ifosfamida; aziridinas o etilen-iminas tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosoureas tales como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; sulfonatos de alquilo tales como busulfano, treosulfano o improsulfano; triazenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino o carboplatino.

La expresión "Antimetabolito" se refiere a una sustancia que bloquea el crecimiento y/o el metabolismo celular interfiriendo en ciertas actividades, generalmente la síntesis de ADN. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinósido, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, desoxicoformicina y pentostatina.

La expresión "Antibiótico antitumoral" se refiere a un compuesto que puede prevenir o inhibir la síntesis de ADN, ARN y/o proteínas. Los ejemplos de antibióticos antitumorales de este tipo incluyen doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

Los "inhibidores mitóticos" previenen la progresión normal de la mitosis y el ciclo celular. En general, los inhibidores de microtúbulos o "taxoides" tales como paclitaxel y docetaxel pueden inhibir la mitosis. Los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, también pueden inhibir la mitosis.

La expresión "Los inhibidores de cromatina" o "inhibidores de la topoisomerasa" son sustancias que inhiben el funcionamiento normal de las proteínas que conforman la cromatina, tales como las topoisomerasas I y II. Los ejemplos de inhibidores de este tipo incluyen, para la topoisomerasa I,

camptotecina y sus derivados, tales como irinotecán o topotecán; para la topoisomerasa II, etopósido, etipósido fosfato y tenipósido.

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

La expresión “Antiestrógeno” o “antagonista de estrógenos” se refiere a cualquier sustancia que disminuye, antagoniza o inhibe la acción de los estrógenos. Los ejemplos de agentes de este tipo son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

La expresión “Antiandrógeno” o “antagonista de andrógenos” se refiere a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de los andrógenos. Los ejemplos de antiandrógenos incluyen flutamida, nilutamida, bicalutamida, espironolactona, ciproterona acetato, finasterida y cimitidina.

Los inmunomoduladores son sustancias que estimulan el sistema inmunitario. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen interferón, interleucinas tales como aldesleucina, OCT-43, denileucina diftitox o interleucina 2, factores de necrosis tumoral tales como tasonermina, u otros tipos de inmunomoduladores tales como lentinano, sizofirán, roquinimex, pidotimod, pegademasa, timopentina, poli I:C o levamisol en combinación con 5-fluorouracilo.

Para más detalles, un experto en la materia puede referirse al manual publicado por la Asociación Francesa Profesores de Química Terapéutica titulado “Química terapéutica, vol. 6, Medicamentos antitumorales y perspectivas en el tratamiento del cáncer, edición TEC y DOC, 2003 [en francés]”.

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

En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición está caracterizada porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona entre

los estabilizadores o inhibidores del huso acromático, preferentemente vinorelbina y/o vinflunina y/o vincristina.

Con el fin de facilitar la unión entre dicho agente citotóxico y el anticuerpo según la invención, pueden introducirse moléculas espaciadoras entre los dos compuestos que van a unirse, tales como el poli(alquilen)glicol polietilenglicol o los aminoácidos; o, en otra forma de realización, pueden utilizarse derivados activos de dichos agentes citotóxicos, en los que se han introducido funciones que pueden reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de unión son bien conocidas por un experto en la materia y no se tratarán con más detalle en la presente descripción.

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

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

Preferentemente, dicha toxina o dicho radioisótopo pueden prevenir el crecimiento o la proliferación de la célula tumoral, en particular inactivar por completo dicha célula tumoral.

También preferentemente, dicha toxina es una toxina de enterobacteria, en particular exotoxina A de *Pseudomonas*.

Los radioisótopos combinados preferentemente con anticuerpos terapéuticos son radioisótopos que emiten rayos gamma, preferentemente yodo¹³¹, itrio⁹⁰, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. También pueden utilizarse en terapia radioisótopos que emiten rayos alfa y beta.

La expresión "Toxina o radioisótopo combinado con por lo menos un anticuerpo de la invención, o un fragmento funcional del mismo" se refiere a cualquier medio que hace posible unir dicha toxina o dicho radioisótopo a ese por lo menos un anticuerpo, particularmente mediante unión covalente entre los dos compuestos, con o sin la introducción de la molécula de unión.

Los ejemplos de agentes que permiten la unión química (covalente), electrostática o no covalente de todos o parte de los elementos del conjugado incluyen, en particular, benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), S-acetil-tio-acetato de N-succinimidilo (SATA), agentes puente con uno o más grupos, con uno o más grupos fenilasida, haciendo reaccionar con rayos ultravioleta (UV), de la manera más preferente N-[4(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), 3(2-piridilditio)-propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de unión, particularmente para radioisótopos, puede consistir en la utilización de agentes quelantes de iones bifuncionales.

Los ejemplos de quelantes de este tipo incluyen los quelantes derivados de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) que se desarrollaron para unir metales, particularmente metales radiactivos, con inmunoglobulinas. Por tanto, DTPA y sus derivados pueden estar sustituidos en la cadena carbonada con diversos grupos de tal manera que se aumente la estabilidad y la rigidez del complejo de metal-ligando (Krejcarek *et al.*, 1977; Brechbiel *et al.*, 1991; Gansow, 1991; patente US nº 4.831.175).

Por ejemplo, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y sus derivados, que se han utilizado ampliamente durante mucho tiempo en fármacos y en biología o bien en su forma libre o bien en un complejo con un ion metálico, muestran la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos que pueden acoplarse con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico, tales

como anticuerpos, para el desarrollo de radio-inmunoconjugados para la terapia del cáncer (Meases *et al.*, 1984; Gansow *et al.*, 1990).

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

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

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

Los cánceres preferidos que pueden prevenirse y/o tratarse incluyen cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer pancreático o cualquier otro cáncer.

La invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, y/o de una composición tal como se describió anteriormente para la preparación de un fármaco para modular la actividad de CXCR4 en una célula.

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

Por tanto, los anticuerpos de la invención, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo, pueden emplearse en un procedimiento para la detección y/o cuantificación de la proteína CXCR4 en una muestra biológica *in vitro*, particularmente para el diagnóstico de enfermedades asociadas a una

expresión anómala de esta proteína, tales como cánceres, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

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

Por tanto, la presente invención también comprende los kits o accesorios para la implementación de un procedimiento tal como se ha descrito, que comprende los siguientes elementos:

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

Ventajosamente, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos pueden inmovilizarse sobre un soporte, particularmente un chip de proteína. Un chip de proteína de este tipo es un objeto de la invención.

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

Debe establecerse que la expresión "muestra biológica" se refiere en la presente memoria a muestras tomadas de un organismo vivo (en particular muestras de sangre, tejido, órgano u otras muestras tomadas de un mamífero, particularmente el hombre) o cualquier muestra que es probable que contenga una proteína CXCR4 de este tipo (tal como una muestra de células, transformadas si es necesario).

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

Los anticuerpos marcados de la invención, o los fragmentos funcionales del mismo, incluyen, por ejemplo, conjugados de anticuerpo (inmunoconjugados), que pueden combinarse, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, α -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetil-colinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa-6 fosfato deshidrogenasa o mediante una molécula tal como biotina, digoxigenina o

5-bromo-desoxiuridina. También pueden combinarse marcadores fluorescentes con los anticuerpos de la invención o fragmentos funcionales del mismo, incluyendo en particular fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, proteína fluorescente verde (GFP), dansilo, umbeliferona, etc. En los conjugados de este tipo, pueden prepararse los anticuerpos de la invención o fragmentos funcionales de los mismos mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia. Pueden unirse con enzimas o marcadores fluorescentes directamente; a través de un grupo espaciador o un grupo de enlace tales como polialdehído, glutaraldehído, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA); o en presencia de agentes de unión tales como los mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Pueden prepararse conjugados que llevan marcadores de fluoresceína mediante reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados también pueden incluir marcadores quimioluminiscentes tales como luminol y dioxetano, marcadores bioluminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o marcadores radiactivos tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹ y yodo¹³¹. Pueden utilizarse los procedimientos existentes conocidos por un experto en la materia para unir radioisótopos con anticuerpos, o bien directamente o bien a través de un agente quelante tal como los EDTA o DTPA mencionados anteriormente, como radioisótopos de diagnóstico. Por tanto, debe mencionarse el marcaje con [¹²⁵I]Na mediante la técnica de la cloramina-T [Hunter W. M. y Greenwood F. C. (1962) *Nature* 194:495]; marcaje con tecnecio^{99m} tal como describen Crockford *et al.* (patente US nº 4.424.200) o unido a través de DTPA tal como describe Hnatowich (patente US nº 4.479.930).

La invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un fármaco destinado a la selección específica como diana de un compuesto que es biológicamente activo hacia células que expresan o sobreexpresan CXCR4.

En el sentido de la presente descripción, un "compuesto biológicamente activo" es cualquier compuesto que puede modular, particularmente inhibir, una

actividad celular, en particular el crecimiento, la proliferación, la transcripción y la traducción de genes.

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

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

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

En la presente descripción, la expresión "vehículo farmacéutico" significa un compuesto, o una combinación de compuestos, que entra en una composición farmacéutica que no produce reacciones secundarias y que, por ejemplo, facilita la administración de los compuestos activos, aumenta su tiempo de vida y/o eficacia en el organismo, aumenta su solubilidad en disolución o mejora su almacenamiento. Se conocen vehículos farmacéuticos de este tipo y los adaptará un experto en la materia según la naturaleza y la vía de administración de los compuestos activos seleccionados.

Preferentemente, los compuestos de este tipo se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea u oral. Más preferentemente, la composición compuesta por el anticuerpo según la invención se administrará en varias dosis espaciadas equitativamente en el tiempo.

Pueden determinarse sus vías de administración, pautas de dosificación y formas galénicas óptimas según los criterios que se tienen en cuenta generalmente cuando se establece un tratamiento apropiado para un paciente tales como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, su tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios experimentados.

Por tanto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un fármaco para la selección

específica como diana de un compuesto que es biológicamente activo hacia células que expresan o sobreexpresan CXCR4.

Aparecen además otras características y ventajas de la invención en la descripción con los ejemplos y las figuras cuyas leyendas se presentan a continuación.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B muestran la expresión de CXCR4 y CXCR2 en células cancerosas mediante análisis de PCRC, respectivamente.

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

Las figuras 3A y 3B muestran la competencia de la unión específica a [¹²⁵I]SDF1 por SDF-1 no marcado (figura 3A) y los AcM 414H5 y 515H7 (figura 3B) en membranas celulares de células CHO-K1 que expresan de manera estable CXCR4 humano de tipo natural (T: unión total; NS: unión no específica).

Las figuras 4A y 4B muestran la modulación de la activación de proteínas G por el AcM 414H5 (figura 4A) y el AcM 515H7 (figura 4B) monitorizando las respuestas de unión a [³⁵S]GTPγS en el receptor CXCR4 de tipo natural expresado de manera estable en células NIH-3T3.

La figura 5 muestra la modulación de la activación de proteínas G por los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 monitorizando las respuestas de unión a [³⁵S]GTPγS en células tumorales humanas HeLa estimuladas con SDF-1 (10 y 100 nM).

Las figuras 6A-6F muestran la modulación de la asociación del receptor CXCR4 con diferentes parejas de interacción por SDF-1 y por los AcM 414H5 y 515H7 a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK293. (Figuras 6A y 6B: homodimerización CXCR4:CXCR4; figuras 6C y 6D: heterodimerización CXCR2:CXCR4 y figuras 6E y 6F: reclutamiento mediado por CXCR4 de β-arrestina).

Las figuras 7A y 7B muestran la inhibición de la producción de AMPc estimulada por forskolina, por SDF-1 y los AcM 414H5 y 515H7 en células NIH3T3 que expresan de manera estable el receptor CXCR4.

La figura 8 muestra la modulación de la activación de proteínas G por los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 monitorizando las respuestas de unión a [³⁵S]GTPγS en el receptor Asn¹¹⁹Ser-CXCR4 mutante constitutivamente activo, expresado de manera estable en células CHO-K1.

La figura 9 ilustra la inhibición de la proliferación de células HeLa inducida por SDF-1, por el AcM 414H5 *in vitro*.

Las figuras 10A y 10B muestran la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF-1, por el AcM 414H5 frente a CXCR4 (figura 10A) y el AcM 515H7 (figura 10B) *in vitro*.

La figura 11 muestra la inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto MDA-MB-231 por el AcM 414H5 anti-CXCR4 (A) y el AcM 515H7 (B) en ratones Nod/Scid.

La figura 12 muestra la actividad del AcM 414H5 anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones Nod/Scid con U937.

Las figuras 13A-13C muestran la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1, por el AcM 515H7 anti-CXCR4 en células CHO-CXCR4 (figura 13A) y células cancerosas MDA-MB-231 (figura 13B), U937 (figura 13C).

La figura 14 muestra la inhibición del tumor del xenoinjerto de KARPAS 299 de células T en ratones Nod/Scid por 414H5.

La figura 15 muestra la actividad del AcM m515H7 anti-CXCR4 murino en el modelo de supervivencia de ratones Nod/Scid con U937.

La figura 16 muestra la actividad del AcM m515H7 anti-CXCR4 murino en la inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto de KARPAS 299 de células T en ratones Nod/Scid.

La figura 17 muestra la competencia de la unión específica a [¹²⁵I]SDF1 por los AcM m414H5 y m515H7 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos en membranas celulares de células CHO-K1 que expresan de manera estable CXCR4 humano de tipo natural (T: unión total; NS: unión no específica).

La figura 18 muestra la modulación de la activación de proteínas G por los AcM m414H5 y m515H7 murinos y por los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos monitorizando las respuestas de unión a [³⁵S]GTPγS en el receptor CXCR4 de tipo natural expresado de manera estable en células NIH-3T3 estimuladas con SDF-1 (10 nM).

La figura 19 muestra la modulación de la activación de proteínas G por los AcM m414H5 y m515H7 anti-CXCR4 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos monitorizando las respuestas de unión a [³⁵S]GTPγS en células tumorales HeLa humanas estimuladas con SDF-1 (10 nM).

Las figuras 20A-20C muestran la modulación de la asociación del receptor CXCR4 con diferentes parejas de interacción por SDF-1 y por los AcM m414H5, c414H5, m515H7 y c515H7 a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK293. (Figura 20A: homodimerización CXCR4:CXCR4; figura 20B: heterodimerización CXCR2:CXCR4 y figuras 20C: reclutamiento mediado por CXCR4 de β-arrestina).

Las figuras 21A y 21B muestran la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 en células CHO-CXCR4 (figura 21A) y en células U937 (figura 21B).

Las figuras 22A y 22B muestran la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF-1, por los AcM m414H5 y c414H5 frente a CXCR4 (figura 22A) y los AcM m515H7 y c515H7 (figura 22B) *in vitro*.

La figura 23 muestra la actividad de los AcM c414H5 y c515H7 anti-CXCR4 quiméricos en el modelo de supervivencia de ratones Nod/Scid con U937.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Expresión de CXCR4 y CXCR2 en células cancerosas

- Análisis de Q-PCR:

Con el fin de cuantificar la expresión relativa de CXCR4 y CXCR2 en diferentes líneas de células cancerosas, se utilizó una RT-PCR en tiempo real.

Se extrajeron muestras de ARN de diferentes líneas celulares utilizando los protocolos RNeasy Mini o Midi (Qiagen Corporation, Francia). Se controlaron las muestras de ARN utilizando el sistema de electroforesis automatizado Experion (BIO-RAD Corporation, Francia) y mostraron una buena calidad/integridad. Se convirtió un μ g de cada muestra de ARN en un molde de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (BIO-RAD Corporation, Francia). Se cuantificaron los niveles de ADNc utilizando PCRs con o bien una sonda TaqMan para CXCR2 o bien SYBERGreen para CXCR4. La comparación de las muestras requiere normalización, de tal modo que se introdujo la referencia interna RPL0. Las sondas TaqMan (usadas para CXCR2) portaban un marcador indicador FAM en 5' y un grupo extintor TAMRA en 3'. Se activó la enzima de PCR mediante calentamiento durante 2 min. a 50°C y 10 min. a 95°C. Se utilizó un procedimiento de dos etapas, 15 s a 95°C y 1 min. a 62°C durante 40 ó 45 ciclos en una mezcla de PCR que contenía 5 μ l de molde de ADNc (dilución 1/20), 1 x PCRc Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems corporation, Branchburg Nueva Jersey, EE.UU.), de 50 a 900 nM de cada cebador y de 50 a 100 nM de sonda en un volumen total de 50 μ l. Se realizaron todas las reacciones utilizando un instrumento iCycler (BIO-RAD Corporation). La Q-PCR permitió determinar el ciclo umbral (Ct). Cuanto más pequeño sea el valor de Ct, más se expresa el gen sometido a prueba. Los cebadores y la sonda para la proteína ribosómica humana, grande, P0, fueron:

cebador directo, 5'-GAAACTCTGCATTCTCGCTTCCTG-3' (SEQ ID N° 32);

cebador inverso, 5'-AGGACTCGTTTGTACCCGTTGA-3' (SEQ ID N° 33);

sonda, 5'-(FAM)- TGCAGATTGGCTACCCAAGTGTGCA-(TAMRA)-3' (SEQ ID N° 34).

Los cebadores para CXCR4 humano (receptor 4 de quimiocina) fueron:

cebador directo, 5'-CTCCTTCATCCTCCTGGAAATC-3' (SEQ ID N° 35);

cebador inverso, 5'-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-3' (SEQ ID N° 36).

Los cebadores y la sonda para CXCR2 humano (receptor 2 de quimiocina) fueron:

cebador directo, 5'-GTGGTCATTATCTATGCCCTGG-3' (SEQ ID N° 37);

cebador inverso, 5'-CGACCCTGCTGTATAAGATGAC-3' (SEQ ID N° 38);

sonda, 5'-(FAM)- TATTCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-3' (SEQ ID N° 39).

En el estudio comparativo, se cuantificó la expresión de dos genes [el gen sometido a prueba (CXCR4 o CXCR2) y RPL0] en dos muestras diferentes: la línea celular sometida a prueba y una línea celular de referencia. La línea celular de referencia correspondía a la línea celular que contenía la expresión más baja del gen cuantificado. Se realizó el cálculo de la expresión génica comparativo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión génica relativa} = (1 + E_{\text{gen}})^{-\Delta\text{Ct}(1)} / (1 + E_{\text{RPL0}})^{-\Delta\text{Ct}(2)}$$

E_{gen} = eficacia de la PCR utilizando los cebadores/la sonda del gen cuantificado

E_{RPL0} = eficacia de la PCR utilizando los cebadores/la sonda de RPL0

Ct = ciclo umbral

$\Delta\text{Ct}(1) = \text{Ct}_{\text{gen}}$ (línea celular sometida a prueba) - Ct_{gen} (línea celular de referencia)

$\Delta\text{Ct}(2) = \text{Ct}_{\text{RPL0}}$ (línea celular sometida a prueba) - Ct_{RPL0} (línea celular de referencia)

Para cada serie de PCR, se calculó un valor de cantidad génica relativa, y se clasificaron las líneas de células cancerosas en grupos considerando sus niveles de expresión desde el más alto hasta el negativo. Todos los datos se presentan en las figuras 1A y 1B. Todas las líneas de células cancerosas sometidas a prueba expresaban CXCR4 (figura 1A) y CXCR2 excepto DU145 y U-87MG para CXCR2 (figura 1B).

-Análisis de FACS:

Se permeabilizaron las líneas de células cancerosas MDA-MB-231, PC3 y U937 y luego se incubaron con o bien 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 [44717 (R&D Systems) frente a su control de isotipo IgG2b (SIGMA)] o bien 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-CXCR2 (anti h-CXCR2, clon 48311, R&D Systems, AcM 331 frente a su control de isotipo IgG2a). Se lavaron entonces las células con BSA al 1%/PBS/NaN₃ al 0,01%. A continuación,

se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. A continuación, se lavaron las células de nuevo dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó el análisis de FACS. Los resultados de estos estudios de unión se proporcionan en la figura 2. Por tanto, células tumorales tales como MDA-MB-231, PC3 y U937 expresaron tanto las proteínas CXCR4 como las CXCR2.

EJEMPLO 2: Generación de anticuerpos monoclonales (AcM) frente a CXCR4 humano

Para generar anticuerpos monoclonales frente a CXCR4, se inmunizaron ratones Balb/c con células NIH3T3-CXCR4 recombinantes y/o péptidos correspondientes a bucles y al extremo N-terminal extracelulares de CXCR4. Los ratones de 6-16 semanas de edad, tras la primera inmunización, se inmunizaron una vez con el antígeno en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea (s.c.) seguido por de 2 a 6 inmunizaciones con antígeno en adyuvante incompleto de Freund s.c. Se monitorizó la respuesta inmunitaria mediante hemorragias retroorbitales. Se examinó el suero mediante ELISA (tal como se describe a continuación) y se utilizaron para las fusiones los ratones con los títulos superiores de anticuerpos anti-CXCR4. Se reforzaron los ratones por vía intravenosa con antígeno dos días antes del sacrificio y la extirpación del bazo.

- ELISA

Para seleccionar los ratones que producían anticuerpos anti-CXCR4, se sometieron a prueba sueros de ratones inmunizados mediante ELISA. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con péptido N-terminal [1-41] purificado conjugado con BSA a 5 µg de péptido equivalente/ml, se incubaron 100 µl/pocillo a 4°C durante la noche, se bloquearon a continuación con 250 µl/pocillo de gelatina al 0,5% en PBS. Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con CXCR4 a cada pocillo y se incubaron 2 horas a 37°C. Se lavaron las placas con PBS y a continuación se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Tras lavar, se revelaron las placas con sustrato TMB, se detuvo la reacción 5 min. más tarde mediante la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M. Se utilizaron los

ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-CXCR4 para la generación de anticuerpos.

- Generación de hibridomas que producen AcM frente a CXCR4

Los esplenocitos de ratones, aislados de un ratón Balb/c que desarrolló los títulos más altos de anticuerpos anti-CXCR4, se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón Sp2/O. Se sembraron en placa las células a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placas de microtitulación seguido por incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía medio de cultivo ultra + L-glutamina 2 mM + piruvato de sodio 1 mM + 1 x HAT. A continuación, se examinaron los pocillos mediante ELISA para detectar anticuerpos de IgG monoclonales anti-CXCR4. A continuación, se subclonaron los hibridomas que secretaban anticuerpos por lo menos dos veces mediante dilución limitante, se cultivaron *in vitro* para generar anticuerpo para análisis adicional.

EJEMPLO 3: Caracterización mediante análisis de FACS de la especificidad de unión de los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 y reconocimiento de líneas de células cancerosas

En este experimento, se examinó la unión específica a CXCR4 humano de los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 mediante análisis de FACS.

Se incubaron células transfectadas NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4, líneas de células cancerosas MDA-MB-231, Hela y U937 con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal 414H5 y 515H7. A continuación, se lavaron las células con BSA al 1%/PBS/NaN₃ al 0,01%. Posteriormente, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. Se lavaron entonces las células de nuevo dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó el análisis de FACS. Los resultados de estos estudios de unión se proporcionan en la siguiente tabla 4 que muestra [intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida mediante FACS] que los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 se unían específicamente a una línea celular transfectada CXCR4-NIH3T3 mientras que no hubo reconocimiento en las células NIH3T3 originales. Estos AcM pudieron reconocer también líneas de células cancerosas humanas, por ejemplo células de cáncer de mama MDA-MB-231, células cancerosas promielocíticas U937 y células cancerosas de cuello uterino Hela.

Los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 reconocieron transfectantes NIH3T3-hCXCR4 mientras que no hubo reconocimiento de las células de tipo natural NIH3T3 originales. Los AcM 414H5 y 515H7 también pudieron reconocer líneas de células cancerosas.

Tabla 4

Clon (10 µg/ml)	MFI en líneas celulares				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	Hela	U937
414H5	21	2162	32	467	95
515H7	16	2752	239	1851	645

EJEMPLO 4: Unión de competencia de los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 por [¹²⁵I]SDF-1 a membranas de CHO-K1 que expresan de manera estable el receptor CXCR4 humano

Este ensayo permite evaluar la capacidad de los AcM 414H5 y 515H7 para competir por la unión de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado al receptor CXCR4 humano, en sitios de unión o bien ortostéricos o bien alostéricos.

Se obtuvieron células CHO-K1, que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano, tras la transfección de células CHO-K1 sin tratar (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamíferos que portaba la secuencia codificante completa del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Se propagaron las células en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham complementado con suero de ternera fetal al 5% (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Se realizaron experimentos de unión a radioligando sobre membranas celulares obtenidas tras la rotura mecánica de células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] seguida por centrifugación (10000 g, 15 min.). Se realizó la unión a [¹²⁵I]SDF-1 (actividad específica: 1500 Ci/mmol) utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad – GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (30 µg/pocillo) en tampón de unión [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%] junto con el compuesto que se iba a evaluar (SDF-1 o AcM), radioligando (1 nM) y finalmente perlas de SPA-WGA-PVT (7,3

mg/pocillo). Se alcanzó el equilibrio de unión tras 1 h a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron las cuentas radiactivas en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se estimó la unión no específica en presencia de SDF-1 no marcado 10 µM.

SDF-1 no marcado inhibió de manera dependiente de la dosis la unión a [¹²⁵I]SDF-1 con un valor de pKi (CI₅₀ = concentración de ligando que produce el 50% de inhibición de la unión específica a [¹²⁵I]SDF-1) de 7,75 ± 0,27 nM (n=4) (figura 3A). En las mismas condiciones experimentales, los AcM anti-CXCR4 (100 nM) competían eficazmente por la unión a [¹²⁵I]SDF-1 con el siguiente orden jerárquico de eficacia de competencia (% de inhibición de [¹²⁵I]SDF-1): 515H7 (64±3%) 414H5 (43±4%) (figura 3B).

EJEMPLO 5: Modulación de la unión a [³⁵S]GTPγS en membranas celulares que expresan el receptor CXCR4 de tipo natural mediante los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4

Este ensayo funcional permite monitorizar la activación de proteínas G a través del receptor CXCR4 humano de tipo natural y su modulación mediante ligandos de CXCR4 y los AcM 414H5 y 515H7.

Se obtuvieron células NIH-3T3 que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 de tipo natural tal como se describió en el ejemplo anterior para células CHO-K1. Se propagaron células HeLa (carcinoma de cuello uterino humano) en medio de cultivo completo [EMEM complementado con FCS al 10%, L-glutamina al 1%, bicarbonato de sodio 2 µ]. Se realizó la unión a [³⁵S]GTPγS sobre membranas celulares obtenidas tras la rotura mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10000 g, 15 min.). Se realizó la incorporación y la detección de [³⁵S]GTPγS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 µg/pocillo) en tampón de unión [Hepes 20 mM, GDP 3 µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4] junto con el compuesto que se iba a evaluar (SDF-1 o AcM de interés), [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 nM) y finalmente perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). Se llevó a cabo la reacción de unión durante 1 h a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se

midieron las cuentas radiactivas en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calculó la potencia antagonista aplicando la ecuación de Cheng Prusoff:

$K_B = [\text{conc. de antago.}] / \{(CE_{50}/CE_{50'})-1\}$ en la que CE_{50} y $CE_{50'}$ son respectivamente la potencia de SDF-1 en presencia y ausencia de AcM.

SDF-1 indujo un aumento dependiente de la dosis de la unión a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, como resultado de la activación de proteínas G mediante el receptor CXCR4. La estimulación máxima de la unión a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ representa respectivamente el 167% y el 320% con respecto a la unión basal a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ para membranas de células HeLa y NIH3T3/CXCR4. La potencia de SDF-1 era similar para ambas líneas celulares y correspondía a $41,3 \pm 9,7$ nM (figuras 4A-4B). En estas condiciones experimentales, la potencia antagonista de los AcM 414H5 y 515H7, tal como se determinó en células NIH3T3/CXCR4, era de 51 nM y 15 nM, respectivamente. Se observó una eficacia antagonista similar para células HeLa (figura 5).

EJEMPLO 6: Asociación de CXCR4 con diferentes parejas de interacción: homo y heterodimerización, reclutamiento de β -arrestina a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y efecto de los AcM 414H5 y 515H7 sobre estos dímeros

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos tras la unión de SDF-1 y/o los AcM 414H5 y 515H7 al receptor CXCR4 al nivel de la formación de homodímero de CXCR4 y heterodímero CXCR2/CXCR4 así como el reclutamiento de la proteína de señalización β -arrestina-2.

Se construyeron vectores de expresión para cada una de las parejas de interacción investigadas como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de llevar a cabo los experimentos de BRET, se transfectaron de manera transitoria células HEK293 con vectores de expresión que codificaban para las parejas de BRET correspondientes: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4/Rluc + CXCR2:YFP] para estudiar la

heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4/Rluc + β -arr2:YFP] para estudiar el reclutamiento de β -arrestina-2 mediado por CXCR4. El día siguiente, se distribuyeron las células en placas de 96 MW blancas recubiertas previamente con polilisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con FBS al 10%]. Se cultivaron, en primer lugar, las células a 37°C con CO₂ al 5% con el fin de permitir la unión de las células a la placa. A continuación, se sometieron las células a privación con 200 μ l de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento de BRET, se retiró el DMEM y se lavaron las células rápidamente con PBS. Se incubaron entonces las células en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 10 min. a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 300 nM en un volumen final de 50 μ l. Tras la incubación durante otros 10 minutos a 37°C, se inició la adquisición de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector de multimarcador Mithras LB940 (Berthold) (1 s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

Se llevó a cabo el cálculo de la razón de BRET tal como se describió previamente (Angers *et al.*, 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, en la que $\text{Cf} = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación muestra que la razón de BRET corresponde a la razón 530/485 nm obtenida cuando están presentes las dos parejas de BRET, corregida mediante la razón 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, cuando sólo está presente en el ensayo la pareja fusionada a Rluc. Por razones de legibilidad, los resultados se expresan en unidades de miliBRET (mBU); mBU corresponde a la razón de BRET multiplicada por 1000.

SDF1 (300 nM) aumentó en aproximadamente un 20% la señal de BRET que resultaba de la proximidad espacial de las proteínas adaptadora y aceptora fusionadas al receptor CXCR4, lo que es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (figuras 6A y 6B). De manera interesante, SDF1 (300 nM) redujo en aproximadamente un 24% la señal de BRET que resultaba de la proximidad espacial de las proteínas adaptadora y aceptora fusionadas a CXCR2 y CXCR4, indicando probablemente también la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (figuras 6C y 6D). En este

último caso, la conformación de CXCR4/CXCR2 activada por SDF-1 parece ser menos favorable para la transferencia de energía BRET. En ambos casos, los AcM 414H5 y 515H7 pudieron modular los cambios conformacionales inducidos por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 (63% de inhibición del aumento de BRET inducido por SDF-1 para 414H5 y 69% de inhibición del aumento de BRET inducido por SDF-1 para 515H7, figuras 6A y 6B, respectivamente) así como para la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 (50% de inhibición de la disminución de BRET inducida por SDF-1 para 414H5 y 90% de inhibición de BRET inducida por SDF-1 para 515H7, figuras 6C y 6D, respectivamente). Los AcM 414H5 y 515H7 también pudieron modular por sí mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de los AcM 414H5 y 515H7 sobre la conformación tanto de homodímeros CXCR4/CXCR4 como de heterodímeros CXCR2/CXCR4. (Figuras 6A, 6B, 6C y 6D).

La activación de CXCR4 por SDF-1 (300 nM) produjo un fuerte reclutamiento de la molécula de señalización intracelular β -arrestina, tal como se muestra por la potenciación del 233% de la señal de BRET (figuras 6E y 6F). Este reclutamiento se inhibió parcialmente mediante los AcM 414H5 y 515H7 (aproximadamente el 20% de inhibición para 414H5 y el 95% para 515H7, figuras 6E y 6F, respectivamente), mostrándose el efecto de los AcM 414H5 y 515H7 sobre la señalización.

EJEMPLO 7: Inhibición mediada por CXCR4 de la producción de AMPc

Se diseñó este ensayo funcional para monitorizar la señalización del receptor CXCR4 al nivel de adenilato ciclasas a través de proteínas Gi/o inhibitoras.

Se aplicó el procedimiento de cAMP LANCE (Perkin Elmer) tal como detalla el proveedor. En resumen, se obtuvieron y se propagaron tal como se describió anteriormente células NIH3T3 que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 de tipo natural. Se recogieron las células utilizando el agente libre de tripsina Versene y se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml en una disolución que contenía el AcM anti-AMPc unido a AlexaFluor (dilución 1/100^a) y compuesto (forskolina, SDF-1 y/o AcM 414H5 y 515H7). Tras la incubación

durante 30 min. a temperatura ambiente, se añadió la mezcla de detección que contenía los complejos de europio-estreptavidina (dilución 1/125^a) y biotina-AMPc (dilución 1/125^a). Tras la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se midió la señal de FRET resultante en un lector de multimarcador Mithras LB940 (Berthold). Los datos se expresan o bien como valores fluorescentes arbitrarios o bien como estimulación relativa frente a la respuesta de SDF-1 tras la resta del efecto de la FK.

La forskolina (FK) estimuló de una manera dependiente de la dosis la producción de AMPc con una potencia de aproximadamente 0,3 μ M en células NIH3T3/CXCR4 (figura 7A). En presencia conjunta de SDF-1, los niveles de AMPc intracelulares disminuyeron como resultado de la activación de la proteína Gi/o inhibidora mediante el receptor CXCR4. La potencia de SDF-1 fue de $5,0 \pm 3,1$ nM (figura 7A). Los AcM 414H5 y 515H7 inhibieron eficazmente el efecto de SDF-1 (100 nM) estimulado por la forskolina en más del 60% para 414H5 y en más del 80% para 515H7 (figura 7B).

EJEMPLO 8: Modulación de la unión a [³⁵S]GTP γ S en membranas celulares que expresan constitutivamente el receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 mutante mediante los AcM 414H5 y 515H7

Este ensayo funcional permite monitorizar la activación de proteínas G a través de un receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 mutante constitutivamente activo (CAM) (véase Zhang *et al.*, 2002). Este ensayo sensible permite discriminar los ligandos de CXCR4 basándose en su actividad intrínseca (agonista parcial, antagonista silencioso o agonista inverso). Tal como se describió previamente por Zhang y colaboradores, los ligandos de CXCR4 tales como AMD3100 o T140 se comportaban respectivamente como agonista parcial y agonista inverso en el receptor CXCR4 CAM. La identificación de un antagonista silencioso puede ser difícil dado que esta clase de molécula debe presentar afinidades similares tanto para estados activos como inactivos de CXCR4 (Wurch *et al.*, 1999).

Se llevó a cabo la introducción de una mutación Asn119Ser en la secuencia codificante del receptor CXCR4 aplicando técnicas de biología molecular convencionales (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange, Stratagene US). Se obtuvieron células CHO-K1 que expresaban de manera estable y constitutiva el

receptor CXCR4 CAM tal como se describió en el ejemplo anterior. Se llevó a cabo la unión a [35 S]GTP γ S sobre membranas celulares obtenidas tras la rotura mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10000 g, 15 min.). Se llevó a cabo la incorporación de [35 S]GTP γ S (actividad específica: 1000 Ci/mmol) utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad – GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 μ g/pocillo) en tampón de unión [Hepes 20 mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4] junto con el compuesto que se iba a evaluar (SDF-1 o AcM), [35 S]GTP γ S (0,2-0,4 nM) y finalmente perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). Se llevó a cabo la reacción de unión durante 1 h a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron las cuentas radiactivas en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer).

SDF-1 (100 nM) estimuló la unión a [35 S]GTP γ S en un 130%. El agonista inverso T140 inhibió la unión a [35 S]GTP γ S tanto basal(- 17%) como estimulada por SDF-1 (- 159%). En cambio, los AcM 414H5 y 515H7 se comportaron como antagonistas silenciosos en CXCR4 CAM, sin alterar la unión a [35 S]GTP γ S basal (figura 8) pero inhibiendo la unión a [35 S]GTP γ S inducida por SDF-1 (figura 8).

EJEMPLO 9: Inhibición de la proliferación de células Hela inducida por SDF-1 mediante el AcM 414H5 frente a CXCR4 *in vitro*

Se cultivaron de manera rutinaria células HeLa de la ATCC en medio EMEM (Lonza Corporation. Verviers. Bélgica), FCS al 10% (SIGMA Corporation. St Louis. EE.UU.), L-Glutamina al 1% (Invitrogen Corporation. Escocia. RU), disolución al 7,5% de bicarbonato de sodio al 2% (Invitrogen Corporation. Escocia. RU). Se dividieron las células 3 días antes de los ensayos de proliferación de modo que eran confluentes.

- Proliferación de células Hela inducida por SDF-1

Se sembraron en placa células HeLa en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio EMEM más L-Glutamina al 1%, disolución al 7,5% de bicarbonato de sodio al 2%). Veinticuatro horas tras la siembra en placa, se añadieron diluciones apropiadas de SDF-1 a células HeLa. Tras un total de 76 horas de cultivo, se pulsaron las células con 0,25 μ Ci de [3 H]timidina (Amersham Biosciences AB.

Uppsala. Suecia) durante 16 horas. Se cuantificó la magnitud de [^3H]timidina incorporada en el ADN mediante recuento de centelleo líquido.

Los resultados se expresan como índice de proliferación = [cpm media de células + SDF-1 / cpm media de células - SDF-1].

Se incubaron células HeLa con SDF-1 (de 0 a 1000 ng/ml). SDF-1 estimuló *in vitro* la proliferación de células HeLa de 1,5 a 2 veces. La concentración de SDF-1 para obtener el índice de proliferación más alto y reproducible fue de 200 ng/ml (25 nM).

- Inhibición de la proliferación de células Hela inducida por SDF-1 in vitro mediante el AcM 414H5 frente a CXCR4

Se sembraron en placa células HeLa en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en 200 μl de medio libre de suero (medio EMEM más L-glutamina al 1%, disolución al 7,5% de bicarbonato de sodio al 2%). Veinticuatro horas tras la siembra en placa, se añadieron por triplicado diluciones apropiadas de AcM 414H5 anti-CXCR4, unos medios de dilución, a células HeLa o bien en presencia o bien en ausencia de SDF-1 a una concentración final de 200 ng/ml (25 nM). Tras un total de 76 horas de cultivo, se pulsaron las células con 0,25 μCi de [^3H]timidina (Amersham Biosciences AB. Uppsala. Suecia) durante 16 horas. Se cuantificó la magnitud de [^3H]timidina incorporada en el ADN mediante recuento de centelleo líquido.

Se expresaron los resultados como la fracción afectada (Fa) calculada utilizando la fórmula:

$$\text{Fa} = [1 - [\text{cpm media de células incubadas con Mab} + \text{SDF-1} / \text{cpm media de células incubadas con medios de dilución} + \text{SDF-1}]] \times 100.$$

Se caracterizó el efecto *in vitro* del AcM 414H5 anti-CXCR4 sobre la proliferación de células HeLa inducida por SDF-1. Se incubaron células HeLa o bien con AcM 414H5 o bien con control con o sin SDF-1 (200 ng/ml). SDF-1 estimuló el crecimiento *in vitro* de células HeLa (de 1,5 a 2 veces). Se obtuvo la curva de dosis-respuesta para el AcM 414H5 tratando las células con diluciones en serie de dos veces de AcM que oscilaban desde 0 hasta 1500 nM 24 h tras la siembra en placa. Cuando se evaluó la proliferación celular 76 horas tras la siembra en placa, cada condición sometida a prueba corresponde a un tiempo de exposición de 48 h a AcM o control. Se expresaron los resultados como fracción afectada utilizando la fórmula Fa descrita anteriormente. Los resultados

(representados en la figura 9) mostraron que el AcM 414H5 frente a CXCR4 inhibió la proliferación de células Hela *in vitro* inducida por SDF-1.

EJEMPLO 10: Efecto de los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 en la migración de células U937 inducida por SDF-1

Para evaluar el efecto inhibitor de los anticuerpos monoclonales 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 en el proceso de migración, se sembraron en placa 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 2%, en la cámara superior de cámaras de migración (placas de 24 pocillos con un tamaño de poro de 8 µm) o bien en presencia o bien en ausencia de SDF-1 en la parte inferior de los pocillos y con o sin los AcM 414H5 y 515H7 en la cámara superior. En esta prueba, se introdujeron IgG2a e IgG2B murinas como controles de isotipo. Dos horas tras la siembra en placa, se contaron las células en migración. Los resultados presentados en las figuras 10A para 414H5 y 10B para 515H7 demostraron que, tal como se esperaba, SDF-1 pudo inducir un aumento significativo de la migración de células U-937. No se observó efecto cuando se incubaron las células con el control de isotipo IgG2. En cambio, para células incubadas con los AcM 414H5 y 515H7, se observó una disminución significativa y reproducible en la migración de células U937 inducida por SDF: el 50% con el AcM 414H5 y más del 80% con el AcM 515H7.

EJEMPLO 11: Inhibición mediante el AcM 414H5 anti-CXCR4 del crecimiento tumoral del xenoinjerto de MDA-MB-231 en ratones Nod/Scid

El objetivo de estos experimentos era evaluar la capacidad de los AcM 414H5 y 515H7 anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento del xenoinjerto de MDA-MB-231 en ratones Nod/Scid.

Se cultivaron de manera rutinaria células MDA-MB-231 de la ECACC en medio DMEM (Invitrogen Corporation, Escocia, RU), FCS al 10% (Sigma, St Louis MD, EE.UU.). Se dividieron las células 48 horas antes del injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se injertaron diez millones de células MDA-MB-231 en PBS en ratones Nod/Scid de 7 semanas de edad (Charles River, Francia). Cinco días tras el implante, pudieron medirse los tumores

($34 \text{ mm}^3 < V^3 < 40 \text{ mm}^3$) y se dividieron los animales en grupos de 6 ratones con un tamaño de tumor comparable. Se trataron los ratones i.p. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de AcM 414H5 y AcM 515H7, respectivamente.

Posteriormente, se les inyectó a los ratones dos veces a la semana 1 mg/dosis/ratón de AcM 414H5 dos veces a la semana o 0,5 mg/dosis/ratón de AcM 515H7 tres veces a la semana. Se introdujo un grupo con PBS como grupo control en este experimento. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos en cada medición utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En estos experimentos, no se observó mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo con PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento tumoral entre D7 y D39 ($p \leq 0,002$) para AcM 415H5 1 mg/dosis o 515H7 0,5 mg/dosis y el volumen tumoral promedio tras 5 semanas de tratamiento se redujo en un 82% y un 50% frente a PBS para los AcM 415H5 y 515H7, respectivamente (figuras 11A y 11B).

EJEMPLO 12: Actividad del AcM 414H5 anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones con U937

Se cultivaron células U937 de la ATCC en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina al 1%. Se dividieron las células dos días antes del injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se inyectaron diez millones de células U937 i.p. en ratones NOD/SCID hembra. Dos días tras el implante, se trataron los ratones s.c. con una dosis de carga de 2 mg de AcM 414H5/ratón y a continuación dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones control recibieron inyecciones de PBS ya que se ha mostrado en estudios previos que no se observaba diferencia en la supervivencia entre ratones a los que se les inyectó PBS y ratones a los que se les administró un control de isotipo de IgG de ratón. Se monitorizó la supervivencia de los ratones cada día.

Los resultados descritos en la figura 12 mostraban que los ratones tratados con el AcM 414H5 presentaban un aumento drástico y significativo en la duración de la vida con T/C% de aproximadamente 343.

EJEMPLO 13: Movilización mediada por el receptor CXCR4 de las reservas de calcio intracelulares

Se diseñó este ensayo funcional para monitorizar la estimulación a través de la señalización del receptor CXCR4 de la ruta de la fosfolipasa C, que induce la liberación de calcio desde reservas intracelulares del retículo endoplasmático.

Se obtuvieron células CHO-K1 que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 de tipo natural tal como se describió en el ejemplo anterior. Se propagaron células MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) y U937 (linfoma humano) en medio de cultivo completo, respectivamente [DMEM complementado con FCS al 10%] y [RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, disolución de aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina al 1%, glucosa 4,5 g/l]. Se sembraron en placa todos los tipos de células en placas de 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado. Se privaron las células durante la noche antes de realizar los experimentos. Se cargaron las células con el colorante de calcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido probenecid 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido por 30 min. a 25°C. Se llevó a cabo la estimulación por SDF-1 mediante inyección directa en cada pocillo. Para experimentos de antagonismo, se añadieron 10 µl de disolución de AcM directamente en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia cinética en un lector de microplacas de fluorescencia multimodo Mithras LB940 (Berthold) utilizando los siguientes parámetros: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10000 unidades arbitrarias. Se registra la fluorescencia en cada pocillo durante 0,1 segundos cada segundo y durante un periodo de tiempo de 20 s antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación, se inyectan 20 µl de SDF-1 y le sigue el registro de los datos durante un periodo de tiempo 2 min. Se lleva a cabo cada condición experimental por duplicado. Se corrigen en primer lugar los valores para cada pocillo restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo control sin células. Se expresan los datos relativos como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida mediante SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) indujo una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, mientras que no se detectó fluorescencia en células CHO-K1 sin tratar. La intensidad máxima alcanzó > 160% con respecto a la fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 30 s tras la estimulación mediante SDF-1; se observaron curvas cinéticas similares tanto con MDA-MB-231 como con U-937 (figuras 13A, 13B, 13C), aunque la intensidad de fluorescencia máxima mediante SDF-1 (100 nM) era inferior (130-140% con respecto a la basal). El anticuerpo 515H7 (133 nM) produjo una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio inducida por SDF-1 (100 nM) en las tres líneas celulares investigadas.

EJEMPLO 14: Inhibición mediante el AcM 414H5 anti-CXCR4 del crecimiento tumoral del xenoinjerto de KARPAS 299 de células T en ratones Nod/Scid

El objetivo de este experimento era evaluar la capacidad del AcM 414H5 anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento del xenoinjerto de KARPAS 299 en ratones Nod/Scid.

Se cultivaron de manera rutinaria células KARPAS 299 de la ECACC en medio RPMI, L-Glu al 1% y FCS al 10% (Sigma, St Louis MD, EE.UU.). Se dividieron las células 48 horas antes del injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se injertaron cinco millones de células KARPAS 299 en PBS en ratones Nod/Scid de 7 semanas de edad (Charles River, Francia). Cinco días tras el implante, pudieron medirse los tumores ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) y se dividieron los animales en grupos de 6 ratones con un tamaño de tumor comparable. Se trataron los ratones i.p. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de AcM 414H5.

A continuación, se les inyectó a los ratones dos veces por semana 1 mg/dosis/ratón de AcM 414H5. Se introdujo un grupo con PBS como grupo control en este experimento. Se midió el volumen tumoral dos veces por semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos en cada medición utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En este experimento, no se observó mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo con PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento tumoral entre D7 y D33 ($p \leq 0,002$) para el AcM 414H5 1 mg/dosis y el

volumen tumoral promedio tras 5 semanas de tratamiento se redujo en un 73% para el AcM 414H5 frente al PBS (figura 14).

EJEMPLO 15: Actividad del AcM 515H7 anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones con U937

Se cultivaron células U937 de la ATCC en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina al 1%. Se dividieron las células dos días tras el injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se inyectaron diez millones de células U937 i.p. en ratones NOD/SCID hembra. Dos días tras el implante, se trataron los ratones s.c. con una dosis de carga de 2 mg de AcM 515H7/ratón y posteriormente dos veces por semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones control recibieron inyecciones de PBS ya que se ha mostrado en estudios previos que no se observaba diferencia en la supervivencia entre ratones a los que se les inyectó PBS y ratones a los que se les administró un control de isotipo de IgG de ratón. Se monitorizó la supervivencia de los ratones cada día.

Los resultados descritos en la figura 15 mostraron que los ratones tratados con el AcM 515H7 presentaban un aumento drástico y significativo en la duración de la vida con T/C% de aproximadamente 280 para el AcM 515H7 (figura 15).

EJEMPLO 16: Inhibición mediante el AcM 515H7 anti-CXCR4 del crecimiento tumoral del xenoinjerto de KARPAS 299 de células T en ratones Nod/Scid

El objetivo de este experimento era evaluar la capacidad del AcM 515H7 anti-CXCR4 para inhibir el crecimiento del xenoinjerto de KARPAS 299 en ratones Nod/Scid.

Se cultivaron de manera rutinaria células KARPAS 299 de la ECACC en medio RPMI, L-Glu al 1% y FCS al 10% (Sigma, St Louis MD, EE.UU.). Se dividieron las células 48 horas antes del injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se injertaron cinco millones de células KARPAS 299 en PBS en ratones Nod/Scid de 7 semanas de edad (Charles River, Francia). Cinco días tras el implante, pudieron medirse los tumores ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) y se dividieron los animales en grupos de 6 ratones con un tamaño de tumor

comprable. Se trataron los ratones i.p. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de AcM 515H7.

A continuación, se les inyectó a los ratones dos veces por semana 1 mg/dosis/ratón de AcM 515H7. Se introdujo un grupo con PBS como grupo control en este experimento. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos en cada medición utilizando una prueba de Mann-Whitney.

En este experimento, no se observó mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo con PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento tumoral entre D7 y D33 ($p \leq 0,002$) para el AcM 515H7 1 mg/dosis y el volumen tumoral promedio tras 5 semanas de tratamiento se redujo en un 63% para el AcM 515H7 frente al PBS (figura 16).

EJEMPLO 17: Producción de los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4

Se diseñaron formatos quiméricos de los AcM 414H5 y 515H7 murinos: corresponden a los dominios variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos murinos de interés, fusionados genéticamente a los dominios constantes de IgG1 y Ckappa humanos. Se produjeron todos los AcM recombinantes tras la transfección transitoria utilizando el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, US).

Se sintetizaron las secuencias de nucleótidos completas correspondientes a los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los AcM 414H5 y 515H7 mediante síntesis génica global (Genecust, Luxemburgo). Se subclonaron en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) que contenía la secuencia codificante completa del dominio constante de la cadena ligera [Ckappa] o bien la pesada [CH1-bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1 humana. Se llevaron a cabo todas las etapas de clonación según técnicas de biología molecular convencionales tal como se describe en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001) o según las instrucciones del proveedor. Se validó completamente cada constructo genético mediante secuenciación de nucleótidos utilizando el kit de secuenciación de ciclo de terminadores Big Dye (Applied Biosystems, US) y se analizó utilizando un analizador genético 3100 (Applied Biosystems, US).

Se hicieron crecer de manera rutinaria células HEK293 EBNA adaptadas a suspensión (Invitrogen, US) en matraces de 250 ml en 50 ml de medio Excell 293 libre de suero (SAFC Biosciences) complementado con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación de 110 rpm). Se llevó a cabo la transfección transitoria con $2 \cdot 10^6$ células/ml utilizando polietilenimina (PEI) (Polysciences) de 25 kDa preparada en agua a una concentración final de 1 mg/ml mezclada y ADN de plásmido (concentración final de 1,25 μ g/ml para una razón de plásmido de cadena pesada con respecto a ligera de 1:1). A las 4 horas de la transfección, se diluyó el cultivo con un volumen de medio de cultivo nuevo para lograr una densidad celular final de 10^6 células/ml. Se monitorizó el procedimiento de cultivo basándose en la viabilidad celular y la producción de AcM. Normalmente, se mantuvieron los cultivos durante de 4 a 5 días. Se purificaron los AcM utilizando un enfoque de cromatografía convencional sobre una resina de proteína A (GE Healthcare, US). Se produjeron todos los AcM diferentes a niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad están comprendidos normalmente entre 6 y 15 mg/l de AcM purificados.

EJEMPLO 18: Caracterización mediante análisis de FACS de la especificidad de unión de los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4 y reconocimiento de líneas de células cancerosas

En este experimento, se examinó mediante análisis de FACS la unión específica a CXCR4 humano de los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4.

Se incubaron células transfectadas NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4 y la línea de células cancerosas MDA-MB-231 con 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal c414H5 y c515H7. A continuación, se lavaron las células con BSA al 1%/PBS/ NaN_3 al 0,01%. A continuación, se añadieron a las células anticuerpos secundarios marcados con Alexa y se dejaron incubar a 4°C durante 20 min. Posteriormente, se lavaron las células de nuevo dos veces. Tras el segundo lavado, se realizó el análisis de FACS. Los resultados de estos estudios de unión se proporcionan en la siguiente tabla 5 que muestra [intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida mediante FACS] que los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4 se unen específicamente a la línea celular transfectada CXCR4-NIH3T3 humana y también

reconocen líneas de células cancerosas humanas, por ejemplo, células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Tabla 5

Clon (10 µg/ml)	MFI en líneas celulares	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c414H5	1039	No sometidas a prueba
c515H7	2294	118

EJEMPLO 19: Unión de competencia de los AcM m414H5 y m515H7 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4 por [¹²⁵I]SDF-1 en membranas de CHO-K1 que expresan de manera estable el receptor CXCR4 humano

Este ensayo permite evaluar la capacidad de los AcM m414H5, m515H7 murinos y los AcM c414H5, c515H7 quiméricos para competir por la unión de [¹²⁵I]SDF-1 radiomarcado al receptor CXCR4 humano, en sitios de unión o bien ortostéricos o bien alostéricos.

Se obtuvieron células CHO-K1, que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 humano tras la transfección de células CHO-K1 sin tratar (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamíferos que portaba la secuencia codificante completa del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Se propagaron las células en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham complementado con suero de ternero fetal al 5% (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Se realizaron experimentos de unión a radioligandos sobre membranas celulares obtenidas tras la rotura mecánica de células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] seguido por centrifugación (10000g, 15 min.). Se llevó a cabo la unión a [¹²⁵I]SDF-1 (actividad específica: 1500 Ci/mmol) utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad – GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (30 µg/pocillo) en tampón de unión [Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%] junto con el compuesto que se iba a evaluar (SDF-1 o AcM), radioligando (1 nM) y finalmente perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). Se alcanzó el equilibrio de unión tras 1 h a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g

durante 10 min.] se midieron las cuentas radiactivas en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se estimó la unión no específica (NS) en presencia de SDF-1 no marcado 10 μ M.

Los AcM anti-CXCR4 (100 nM) competían eficazmente por la unión a [125 I]SDF-1 con el siguiente orden jerárquico de eficacia de competencia (% de inhibición de [125 I]SDF-1): m515H7 (62 $\pm$ 10%), c515H7 (55 $\pm$ 4%), m414H5 (30 $\pm$ 5%) y c414H5 (21 $\pm$ 10%) (figura 17).

EJEMPLO 20: Modulación de la unión a [35 S]GTP γ S en membranas celulares que expresan el receptor CXCR4 de tipo natural mediante los AcM m414H5 y m515H7 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4

Este ensayo funcional permite monitorizar la activación de proteínas G a través del receptor CXCR4 humano de tipo natural y su modulación mediante los AcM m414H5, m515H7 murinos y los AcM c414H5, c515H7 quiméricos antiCXCR4.

Se obtuvieron células NIH-3T3 que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 de tipo natural tal como se describió en el ejemplo anterior para células CHO-K1. Se propagaron células HeLa (carcinoma de cuello uterino humano) en medio de cultivo completo [EMEM complementado con FCS al 10%, L-glutamina al 1%, bicarbonato de sodio 2 μ M]. Se llevó a cabo la unión a [35 S]GTP γ S sobre membranas celulares obtenidas mediante rotura mecánica en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM] y centrifugación adicional (10000 g, 15 min.). Se llevó a cabo la incorporación y detección de [35 S]GTP γ S (actividad específica: 1000 Ci/mmol) utilizando la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad - GE Healthcare). En resumen, se incubaron membranas celulares (10 μ g/pocillo) en tampón de unión [Hepes 20 mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7,4] junto con el compuesto que se iba a evaluar (SDF-1 y AcM de interés), [35 S]GTP γ S (0,2-0,4 nM) y finalmente perlas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/pocillo). Se llevó a cabo la reacción de unión durante 1 h a 25°C. Tras la centrifugación [1000 g durante 10 min.] se midieron las cuentas radiactivas en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calculó la Cl₅₀ para cada AcM.

En estas condiciones experimentales, las CI_{50} de los AcM m414H5, c414H5, m515H7 y c515H7, tal como se determinó en células NIH3T3/CXCR4 eran de 1,6 nM, 1,1 nM, 1,9 nM y 1,5 nM, respectivamente (figura 18). Las CI_{50} de los AcM m414H5, c414H5, m515H7 y c515H7 determinadas utilizando células Hela en las mismas condiciones experimentales eran de 0,5 nM, 0,3 nM, 0,2 nM y 0,6 nM, respectivamente (figura 19).

EJEMPLO 21: Asociación de CXCR4 con diferentes parejas de interacción: homo y heterodimerización, reclutamiento de β -arrestina a través del enfoque de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y efecto de los AcM m414H5, m515H7 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos sobre estos dímeros

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos tras la unión de SDF-1 y/o los AcM m414H5, m515H7 murinos y los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos al receptor CXCR4 al nivel de la formación de homodímero de CXCR4 y heterodímero CXCR2/CXCR4 así como el reclutamiento de la proteína de señalización β -arrestina-2.

Se construyeron vectores de expresión para cada una de las parejas de interacción investigadas como proteínas de fusión con el colorante correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc y proteína fluorescente amarilla, YFP) aplicando técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de llevar a cabo los experimentos de BRET, se transfectaron de manera transitoria células HEK293 con vectores de expresión que codificaban para las parejas de BRET correspondientes: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4/Rluc + CXCR2-YFP] para estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4/Rluc + β -arr2-YFP] para estudiar el reclutamiento de β -arrestina-2 mediado por CXCR4. El día siguiente, se distribuyeron las células en placas de 96 MW blancas recubiertas previamente con polilisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con FBS al 10%]. Se cultivaron, en primer lugar, las células a 37°C con CO_2 al 5% con el fin de permitir la unión de las células a la placa. A continuación, se sometieron las células a privación con 200 μ l de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento de BRET, se retiró el DMEM y se lavaron las células

rápidamente con PBS. Se incubaron entonces las células en PBS en presencia o ausencia de anticuerpo, 15 min. a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 μ l. Tras la incubación durante 5 minutos a 37°C y la incubación adicional durante 20 min. a temperatura ambiente sólo para homo y heterodímeros, se inició la adquisición de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el lector de multimarcador Mithras LB940 (Berthold) (1 s/longitud de onda/pocillo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

Se llevó a cabo el cálculo de la razón de BRET tal como se describió previamente (Angers *et al.*, 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, en la que $\text{Cf} = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación muestra que la razón de BRET corresponde a la razón 530/485 nm obtenida cuando están presentes las dos parejas de BRET, corregida mediante la razón 530/485 nm obtenida en las mismas condiciones experimentales, cuando sólo está presente en el ensayo la pareja fusionada a Rluc. Por razones de legibilidad, los resultados se expresan en unidades de miliBRET (mBU); mBU corresponde a la razón de BRET multiplicada por 1000.

SDF1 (100 nM) aumentó en aproximadamente un 10% la señal de BRET que resultaba de la proximidad espacial de las proteínas donadora y aceptora fusionadas al receptor CXCR4, lo que es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (figura 20A). De manera interesante, SDF1 (100 nM) redujo en aproximadamente un 17% la señal de BRET que resultaba de la proximidad espacial de las proteínas donadora y aceptora fusionadas a CXCR2 y CXCR4, indicando probablemente también la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (figura 20B). En este último caso, la conformación de CXCR4/CXCR2 activada por SDF-1 parece ser menos favorable para la transferencia de energía BRET. En ambos casos, los AcM m414H5, c414H5 y m515H7, c517H7 pudieron modular los cambios conformacionales inducidos por SDF-1 para homodímeros de CXCR4 (75% de inhibición del aumento de BRET inducido por SDF-1 para c414H5 y 96% de inhibición del aumento de BRET inducido por SDF-1 para c515H7, figura 20A) así como para la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 (77% de inhibición de la

disminución de BRET inducida por SDF-1 para c414H5 y 98% de inhibición de la disminución de BRET inducida por SDF-1 para c515H7, figura 20B). Los AcM m414H5, c414H5, m515H7 y c515H7 también pudieron modular por sí mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de estos AcM sobre la conformación tanto de homodímeros CXCR4/CXCR4 como de heterodímeros CXCR2/CXCR4. (Figuras 20A y 20B).

La activación de CXCR4 por SDF-1 (100 nM) produjo un fuerte reclutamiento de la molécula de señalización intracelular β -arrestina, tal como se muestra por la potenciación del 400% de la señal de BRET (figura 20C). Este reclutamiento se inhibió parcialmente mediante los AcM c414H5 y c515H7 (aproximadamente el 63% de inhibición para c414H5 y el 93% para c515H7, figura 20C), mostrándose el efecto de estos AcM sobre la señalización.

EJEMPLO 22: Movilización mediada por el receptor CXCR4 de las reservas de calcio intracelulares

Se diseñó este ensayo funcional para monitorizar la estimulación a través de la señalización del receptor CXCR4 de la ruta de la fosfolipasa C, que induce la liberación de calcio desde reservas intracelulares del retículo endoplasmático.

Se obtuvieron células CHO-K1 que expresaban de manera estable y constitutiva el receptor CXCR4 de tipo natural tal como se describió en el ejemplo anterior. Se propagaron células U937 (linfoma humano) en medio de cultivo completo, respectivamente [DMEM complementado con FCS al 10%] y [RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, disolución de aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina al 1%, glucosa 4,5 g/l]. Se sembraron en placa todos los tipos de células en placas de 96MW negras a una densidad de 100.000 células/pocillo en medio de cultivo apropiado. Se privaron las células durante la noche antes de realizar los experimentos. Se cargaron las células con el colorante de calcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido probenecid 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido por 30 min. a 25°C. Se llevó a cabo la estimulación por SDF-1 mediante inyección directa en cada pocillo. Para experimentos de antagonismo, se añadieron 10 μ l de disolución de AcM directamente en el tampón de carga por lo menos 10 min. antes de SDF-1. Se

llevaron a cabo mediciones de fluorescencia cinética en un lector de microplacas de fluorescencia multimodo Mithras LB940 (Berthold) utilizando los siguientes parámetros: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10000 unidades arbitrarias. Se registra la fluorescencia en cada pocillo durante 0,1 segundos cada segundo y durante un periodo de tiempo de 20 s antes de la inyección de SDF-1 (señal basal). A continuación, se inyectan 20 µl de SDF-1 y le sigue el registro de los datos durante un periodo de tiempo 2 min. Se lleva a cabo cada condición experimental por duplicado. Se corrigen, en primer lugar, los valores para cada pocillo restando la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por un pocillo control sin células. Se expresan los datos relativos como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida mediante SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) indujo una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, mientras que no se detectó fluorescencia en células CHO-K1 sin tratar. La intensidad máxima alcanzó > 140% con respecto a la fluorescencia basal y se observó a aproximadamente 40 s tras la estimulación mediante SDF-1; se observaron curvas cinéticas similares con células U-937 (figuras 21A, 21B). El anticuerpo quimérico c515H7 (133 nM) produjo una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio inducida por SDF-1 (100 nM) en ambas líneas celulares investigadas.

EJEMPLO 23: Efecto de los AcM m414H5, m515H7 murinos y los AcM c414H5, c515H7 quiméricos anti-CXCR4 sobre la migración de células U937 inducida por SDF-1

Para evaluar el efecto inhibitor de los AcM m414H5, m515H7, c414H5 y c515H7 anti-CXCR4 sobre el proceso de migración, se sembraron en placa 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 2%, en la cámara superior de cámaras de migración (placas de 24 pocillos con un tamaño de poro de 8 µm) o bien en presencia o bien en ausencia de SDF-1 en la parte inferior de los pocillos y con o sin los AcM m414H5, m515H7, c414H5 y c515H7 en la cámara superior. En esta prueba, se introdujeron IgG2a e IgG2B murinas como controles de isotipo. Dos horas tras la siembra en placa, se contaron las células en migración. Los resultados presentados en las figuras 22A (para c414H5 frente a m414H5) y 22B (para c515H7 frente a m517H7) demostraron que, tal como se

esperaba, SDF-1 pudo inducir un aumento significativo de la migración de células U-937. No se observó efecto cuando se incubaron las células con el control de isotipo IgG2. En cambio, para células incubadas con los AcM m414H5, m515H7, c414H5 y c515H7, se observó una disminución significativa y reproducible en la migración de células U937 inducida por SDF: aproximadamente el 50% con los AcM c414H5 y m414H5 y más del 80% con los AcM c515H7 y m515H7.

EJEMPLO 24: Actividad de los AcM c414H5 y c515H7 quiméricos anti-CXCR4 en el modelo de supervivencia de ratones con U937

Se cultivaron células U937 de la ATCC en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina al 1%. Se dividieron las células dos días antes del injerto de modo que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Se injertaron diez millones de células U937 i.p. en ratones NOD/SCID hembra. Dos días tras el implante, se trataron los ratones s.c. con una dosis de carga de 2 mg de AcM c414H5 o c515H7/ratón y luego dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones de control recibieron inyecciones de PBS ya que se ha mostrado en estudios previos que no se observaba diferencia entre ratones a los que se les inyectó PBS y ratones a los que se les administró un control de isotipo de IgG de ratón. Se monitorizó la supervivencia de los ratones cada día.

Los resultados descritos en la figura 23 mostraban que los ratones tratados con los AcM c414H5 y c515H7 presentaban un aumento drástico y significativo en la duración de la vida con T/C% de aproximadamente 210 y 180 para c414H5 y c515H7, respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Anticuerpos anti-cxcr4 nuevos y su utilización para el tratamiento del
cáncer

<130> D26935

<150> Documento EP 08305631.7

<151> 01-10-2008

<150> US 61/136,772

<151> 01-10-2008

<150> US 61/173,743

<151> 29-04-2009

<160> 71

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 2

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser
20 25 30

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

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

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

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

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

- <210> 14
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

- 91 -

1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 15
<211> 36
<212> ADN

- 95 -

tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagtaca gtgcatctgt gaagggt 57

<210> 27

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 27

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgtac aacagtagaa cccgaaagaa ctactggct 120

tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 28

<211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 28

gaggtgaagc tggtagagtc tggaggaggc ttgtacagc ctgggggttc tctgagactc 60

tcctgtacaa ctctgggtt cacttcact gattactaca tgagctgggt ccgccagtct 120

ccaggaaagg cacttgagtg gttgactttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180

gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggtc accatctcca gagataattc ccaaagcatc 240

ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300

gatatcccg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 29

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met

1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu

20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile

35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly

50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu

65 70 75 80

- 97 -

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val

85

90

95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val

100

105

110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala

115

120

125

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

130

135

140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val

145

150

155

160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn

165

170

175

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

180

185

190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu

195

200

205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser

210

215

220

- 98 -

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30
<211> 356
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

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

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

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

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile
 50 55 60

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

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

Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu
 100 105 110

- 100 -

Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val
115 120 125

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

Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val
145 150 155 160

Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe
165 170 175

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

Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile
195 200 205

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

Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
225 230 235 240

Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp

- 101 -

245 250 255

Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu
260 265 270

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

Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile
290 295 300

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

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

Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser
340 345 350

Phe His Ser Ser
355

<210> 31
<211> 360

- 102 -

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val

- 103 -

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr

145 150 155 160

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu

165 170 175

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val

180 185 190

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

195 200 205

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu

210 215 220

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys

225 230 235 240

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val

245 250 255

- 104 -

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

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

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

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

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

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

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

- <210> 32
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

- 111 -

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

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

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

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

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

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

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

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

- 112 -

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

- <210> 52
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 52
cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

- <210> 53
- <211> 24

- 115 -

<210> 61

<211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 61

tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagactaca gtgcatctgt gaggggt 57

<210> 62

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 62

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct 120

tggtagcagc agaagccagg gcagtcctct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 180

gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 240

atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaaatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 63

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 63

gaggtgaacc tggaggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctggggggttc tctgagactc 60

tcctgtgcaa cttctgggtt caccttcact gataactaca tgagttgggt ccgccagcct 120

ccaggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180

gactacagtg catctgtgag gggtcgggtc accatctcaa gagataattc ccaaagcatc 240

ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300

gatgtcgggtt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 64

<211> 239

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

- 117 -

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe
 100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

- 118 -

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 65

<211> 467

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Phe Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu
50 55 60

- 119 -

Glu Trp Leu Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser
 100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

- 120 -

195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

- 121 -

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 66
<211> 239
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 66

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr
 85 90 95

- 123 -

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 67
<211> 469
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 67

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Ile Gln Cys Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
50 55 60

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

Tyr Ser Ala Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95

- 125 -

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

- 127 -

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 68

<211> 720

<212> ADN

<213> Mus musculus

- 128 -

<400> 68

atggagtcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtc gagtctgtac aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180

tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gtttttact gcaagcaatc ttataatctt 360

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggtagccgc tcccagcgtg 420

ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540

agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600

agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660

gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 720

<210> 69

<211> 1404

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 69

atgaagctgt ggctgaactg ggtgttctg gtgacctgc tgaacggctt ccagtgcgaa 60

- 129 -

gtgaaactgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagccag gcggcagcct gagactgagc 120
tgcaccacct ccggcttcac ctacaccgac tactacatga gctgggtgcg ccagagcccc 180
ggcaaggccc tggaatggct gaccttcac cggaacaagg ccaacggcta caccaccgag 240
tacagcgcca gcgtaaggg ccggttcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacacct gcgggcccag gactccgcca cctactactg cgccagagac 360
atccccggct tcgcctactg gggccagggc accctgggtga ccgtgtccgc cgccagcacc 420
aaggggccaa gcgtgttccc gctagcccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 480
gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccc tgaccgtgtc ctggaacagc 540
ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 600
agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcaccagac ctacatctgt 660
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagtggagcc caagagctgt 720
gacaagaccc acacctgccc cccctgccc gccccgagc tgctgggcgg acccagcgtg 780
ttctgttc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 840
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 960
agggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgtaagggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaag agaccatcag caaggccaag 1080

- 130 -

ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcagggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1260

gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1320

aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctgagcctgt ccccaggcaa gtga 1404

<210> 70

<211> 720

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 70

atggagtcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct 180

tggtagcagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 240

gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 300

atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaatctt 360

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggtagggccgc tcccagcgtg 420

ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

- 131 -

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 660
gtgaccaccc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 720

<210> 71

<211> 1410

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 71

atgaagatgt ggctgaactg ggtgttctctg gtgaccctgc tgaacggcat ccagtgcgaa 60
gtgaacctgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagcctg ggggcagcct gagactgagc 120
tgcgccacct ccggcttcac cttcaccgac aactacatga gctgggtgcg ccagccccct 180
ggcaaggccc tggaatggct gggcttcacg cggaacaagg ccaacggcta caccaccgac 240
tacagcgcca gcgtgcgggg cagattcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacgccct gcgggccgag gacagcgcca cctactactg tgcccgggac 360
gtgggcagca actacttcga ctactggggc cagggcacca cactgaccgt gtccagcgcc 420
agcaccaagg gcccctccgt gttcccgtta gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 480
acagccgccc tgggtgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 540

- 132 -

aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 600
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 660
atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaagggtg acaagagagt ggagcccaag 720
agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgcccagccc ccgagctgct gggcggaccc 780
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 840
gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtccac gaggaccag aggtgaagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagccca gagaggagca gtacaacagc 960
acctacaggg tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggccctg ccagcccca tcgaaaagac catcagcaag 1080
gccaagggcc agccaagaga gcccaggtg tacaccctgc caccagcag ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggt tctaccaag cgacatgcc 1200
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccagtgctg 1260
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1320
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1380
aagagcctga gcctgtcccc aggcaagtga 1410

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4, o uno de sus derivados o fragmentos funcionales, capaz de inhibir la activación de CXCR4, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - i) examinar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos capaces de unirse específicamente a CXCR4 y también modular la activación de CXCR4;
 - ii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de inducir un cambio conformacional de los homodímeros de CXCR4, y a continuación
 - iii) someter a prueba los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de inducir un cambio conformacional de los heterodímeros CXCR4/CXCR2.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa ii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis de BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40% de la señal de BRET.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis de BRET en células que expresan ambos CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40% de la señal de BRET.
4. Anticuerpo aislado, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que puede obtenerse mediante un procedimiento según la reivindicación 1.
5. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 4, caracterizado porque consiste en un anticuerpo monoclonal.
6. Anticuerpo aislado, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 4, caracterizado porque comprende por lo menos

una CDR seleccionada de entre las CDR de secuencias que comprenden por lo menos las SEQ ID nº 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

7. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID Nº 1, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID Nº 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID Nº 3.
8. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID Nº 9, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID Nº 10 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID Nº 3.
9. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID Nº 7, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID Nº 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID Nº 8.
10. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID Nº 11, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID Nº 12 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID Nº 6.
11. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende:
 - una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID Nº 1, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID Nº 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID Nº 3; y
 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID Nº 7, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID Nº 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID Nº 8.
12. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende:

- 135 -

- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 9, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 10 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 3; y
 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 11, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 12 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 6.
13. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 13, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 14.
14. Anticuerpo aislado, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 4, caracterizado porque comprende por lo menos una CDR seleccionada de entre las CDR de secuencias que comprenden por lo menos las SEQ ID N° 40, 2, 41, 42, 5 ó 43.
15. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 40, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41.
16. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 46, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 47 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41.
17. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 44, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 45.

18. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 48, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 49 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 43.
19. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende:
- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 40, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 2 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41; y
 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 44, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 5 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 45.
20. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende:
- una cadena ligera que comprende la CDR-L1 de la secuencia SEQ ID N° 46, la CDR-L2 de la secuencia SEQ ID N° 47 y la CDR-L3 de la secuencia SEQ ID N° 41; y
 - una cadena pesada que comprende la CDR-H1 de la secuencia SEQ ID N° 48, la CDR-H2 de la secuencia SEQ ID N° 49 y la CDR-H3 de la secuencia SEQ ID N° 43.
21. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 50, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 51.
22. Hibridoma murino seleccionado de entre el hibridoma presentado en el CNCM, Instituto Pasteur, París, el 22 de octubre de 2007, con el número I-3860 o presentado en el CNCM, Instituto Pasteur, París, el 25 de junio de 2008, con el número I-4019.

23. Anticuerpo secretado por el hibridoma según la reivindicación 22.
24. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según la reivindicación 6 ó 14 caracterizado porque consiste en un anticuerpo quimérico.
25. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según las reivindicaciones 6 y 24, caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 64, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 65.
26. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según las reivindicaciones 14 y 24, caracterizado porque comprende una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 66, y porque comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 67.
27. Ácido nucleico aislado caracterizado porque se selecciona de entre los siguientes ácidos nucleicos:
- un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o para un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21 y 23 a 26;
 - un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico tal como se define en a);
 - un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar en condiciones altamente rigurosas con por lo menos una de las CDR de las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID N° 15 a 26 o SEQ ID N° 52 a 61; y
 - un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar en condiciones altamente rigurosas con por lo menos la cadena ligera de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N° 27 o SEQ ID N° 62 o SEQ ID N° 68 ó 70 y/o la cadena pesada de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N° 28 o SEQ ID N° 63 o SEQ ID N° 69 ó 71.

28. Vector compuesto por un ácido nucleico según la reivindicación 27.
29. Célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 28.
30. Animal transgénico, a excepción del hombre, que comprende una célula transformada por un vector según la reivindicación 29.
31. Procedimiento para producir un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21 y 23 a 26, caracterizado porque dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
- cultivar en un medio de las condiciones de cultivo adecuadas para una célula huésped según la reivindicación 29; y
 - recuperar de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de este modo a partir del medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.
32. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21 y 23 a 26, para su utilización como fármaco.
33. Composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21, 23 a 26 y 32.
34. Composición según la reivindicación 33, caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para su utilización de una forma simultánea, separada o extendida, un anticuerpo antitumoral distinto de un anticuerpo dirigido contra CXCR4.
35. Composición según las reivindicaciones 33 ó 34, caracterizado porque comprende, además, como producto de conjugación o combinación para su utilización de una forma simultánea, separada o extendida, un agente citotóxico/citostático, una toxina celular y/o un radioisótopo.

36. Composición según una de las reivindicaciones 33 a 35, para su utilización como fármaco.
37. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21, 23 a 26 y 32, y/o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, como fármaco para modular la actividad de CXCR4 en una célula.
38. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, según una de las reivindicaciones 4 a 21, 23 a 26 y 32, y/o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, para la prevención o el tratamiento del cáncer.
39. Anticuerpo, o compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, y/o de una composición según la reivindicación 38, caracterizado porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado de entre cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de colon.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado nuevo, o a los compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo, capaz de unirse a CXCR4 pero también inducir cambios conformacionales de los homodímeros y/o heterodímeros CXCR4.

Más particularmente, la presente invención se refiere a los anticuerpos 414H5 y 515H7, específicos frente a la proteína CXCR4, así como a su utilización para el tratamiento del cáncer. También se cubren composiciones farmacéuticas compuestas por dichos anticuerpos y un procedimiento para la selección de dichos anticuerpos.

Cambio en veces en la expresión de CXCR4 frente a la línea celular de referencia

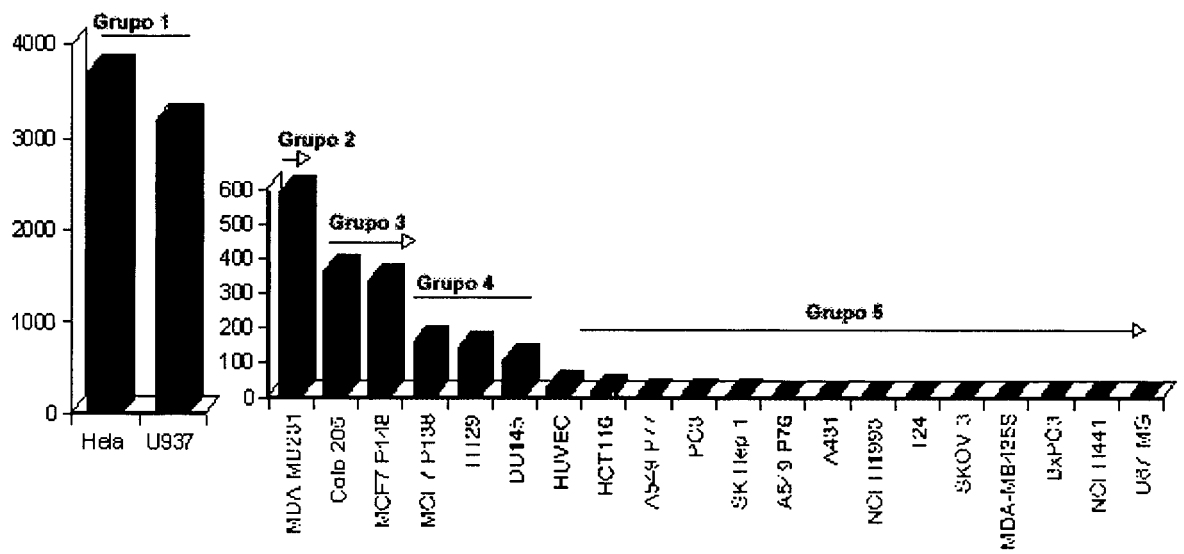


FIGURA 1A

Cambio en veces en la expresión de CXCR2 frente a la línea celular de referencia

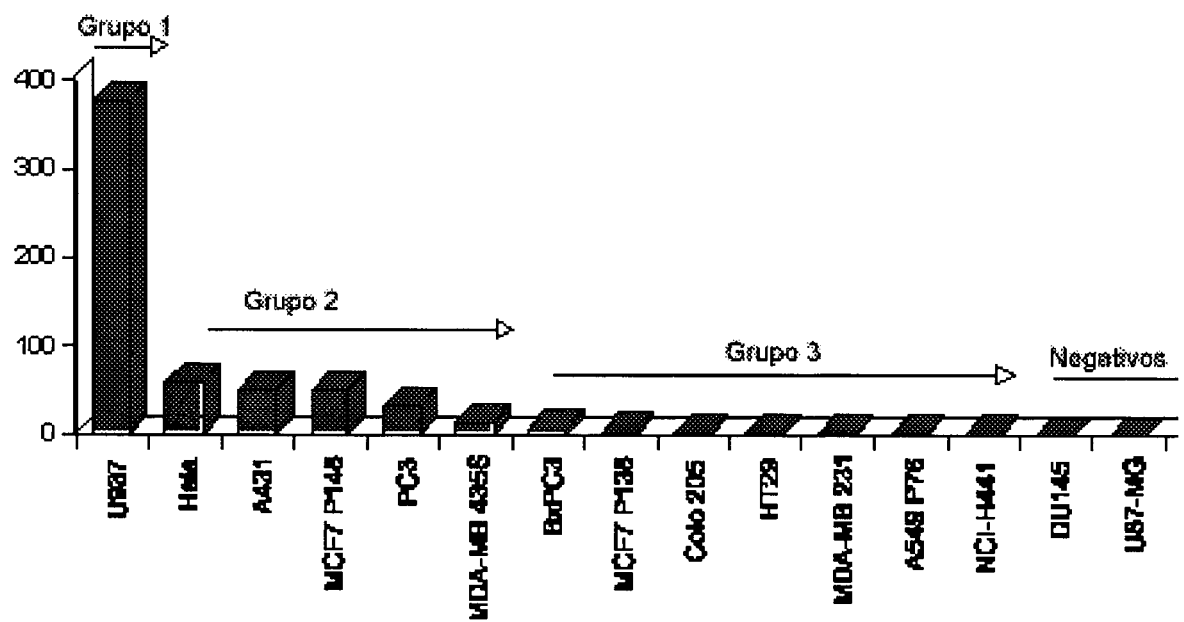


FIGURA 1B

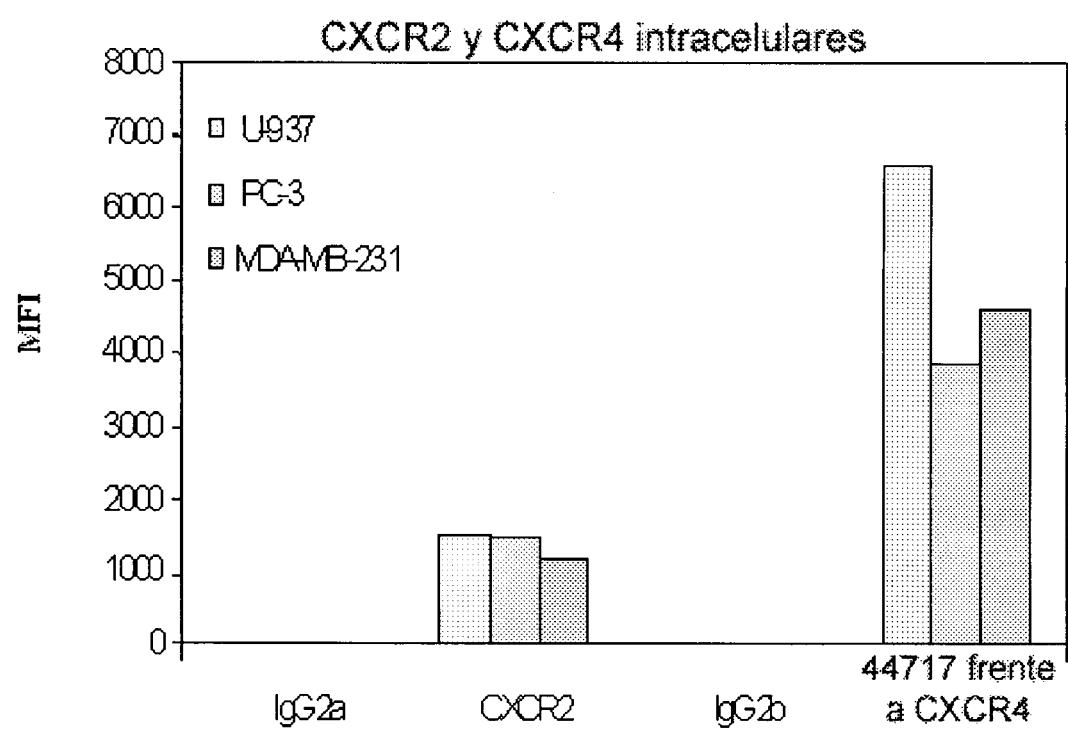


FIGURA 2

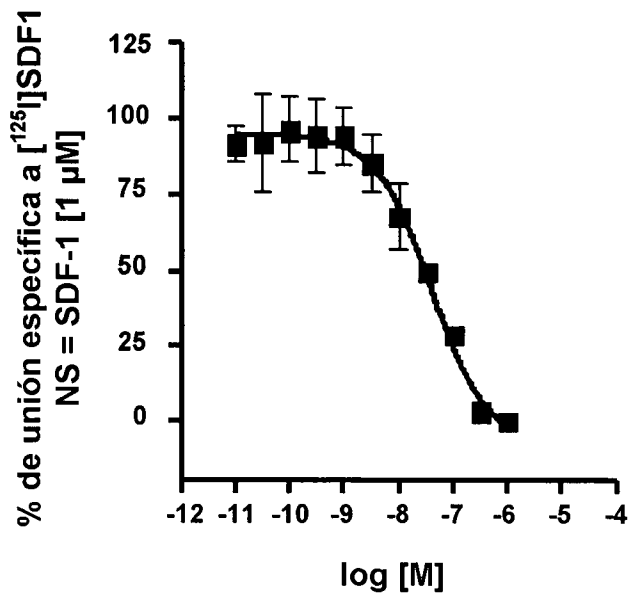


FIGURA 3A

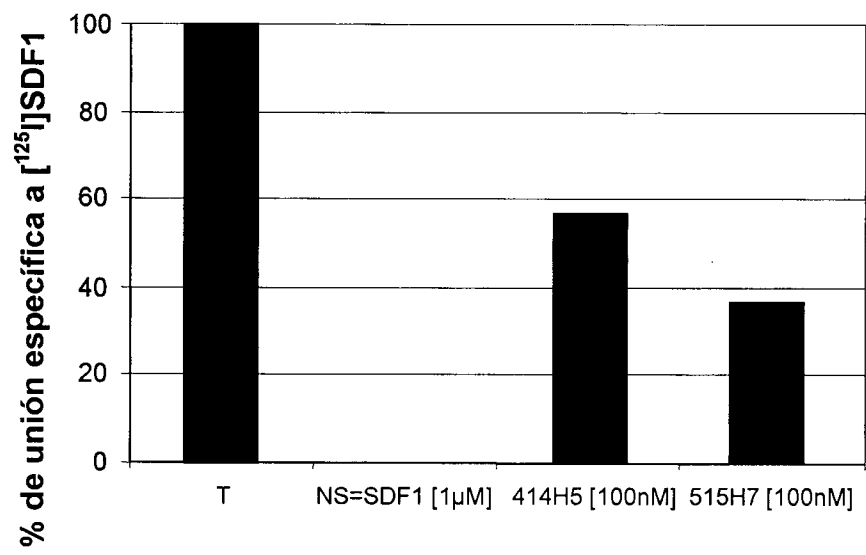


FIGURA 3B

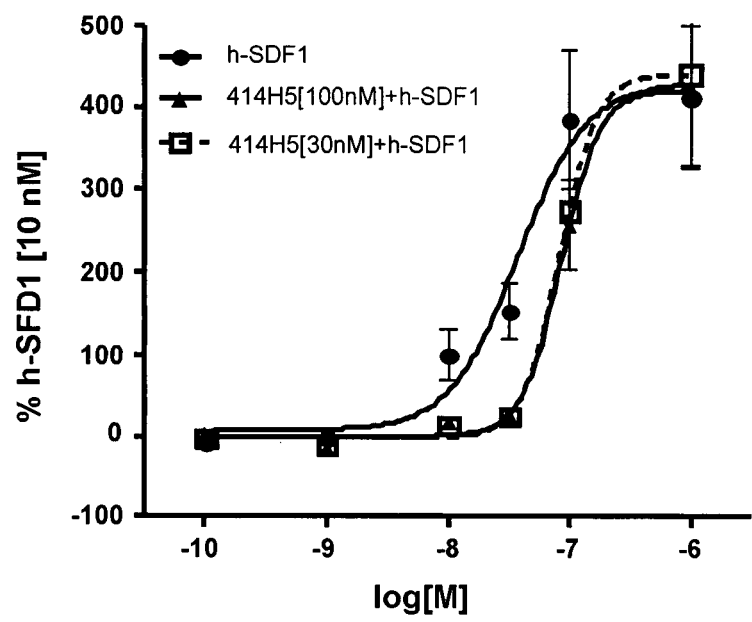


FIGURA 4A

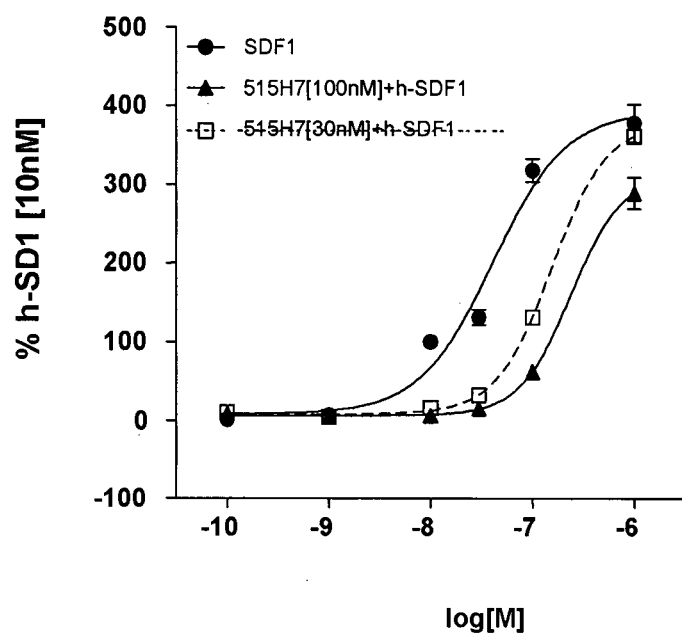


FIGURA 4B

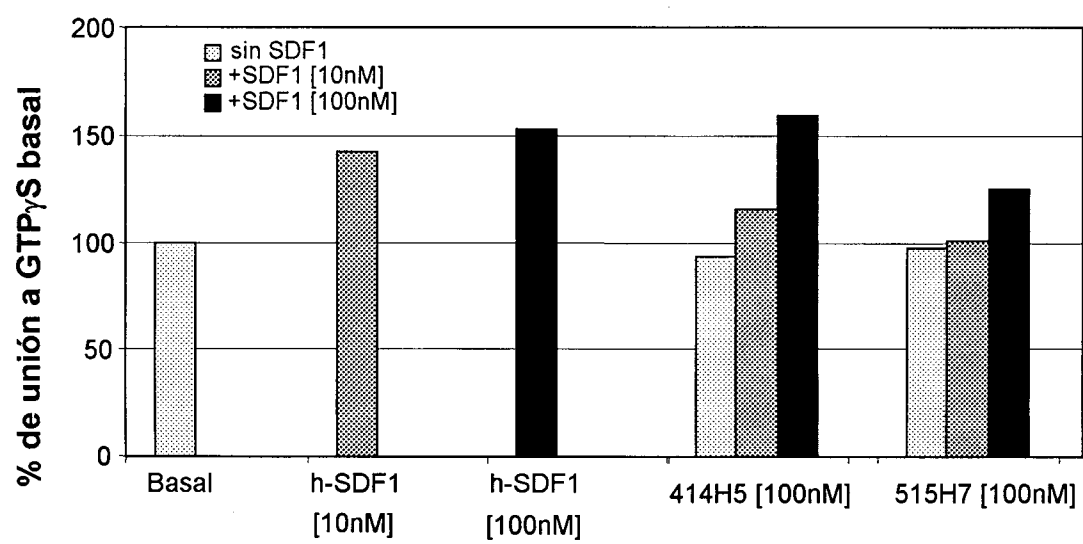


FIGURA 5

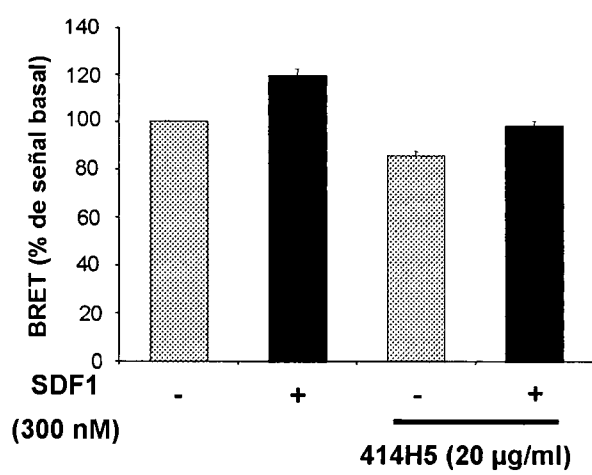


FIGURA 6A

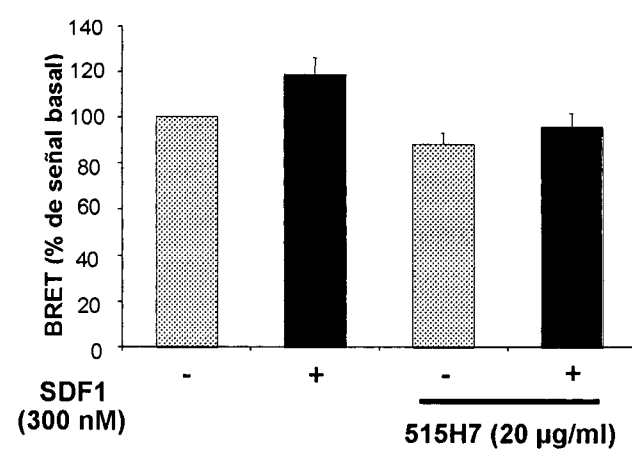


FIGURA 6B

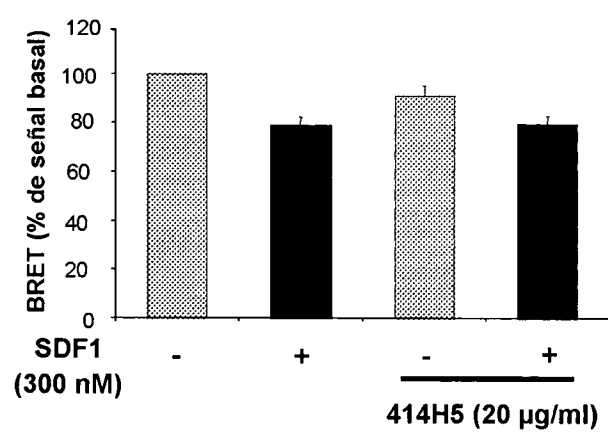


FIGURA 6C

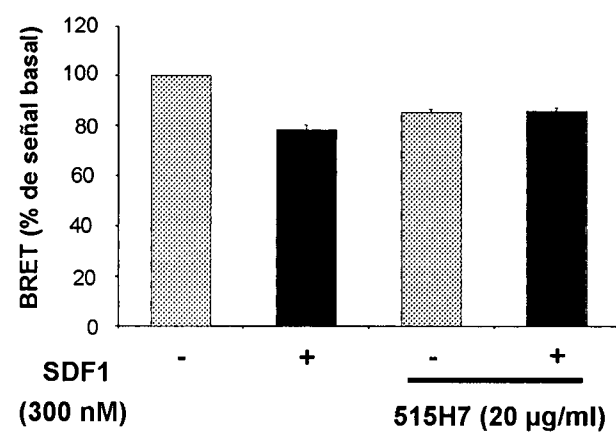


FIGURA 6D

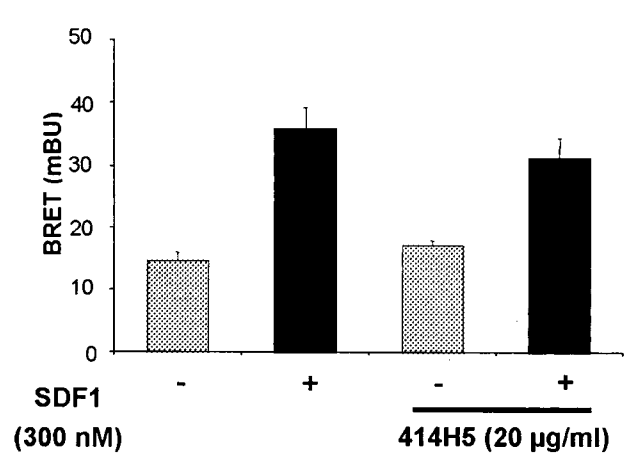


FIGURA 6E

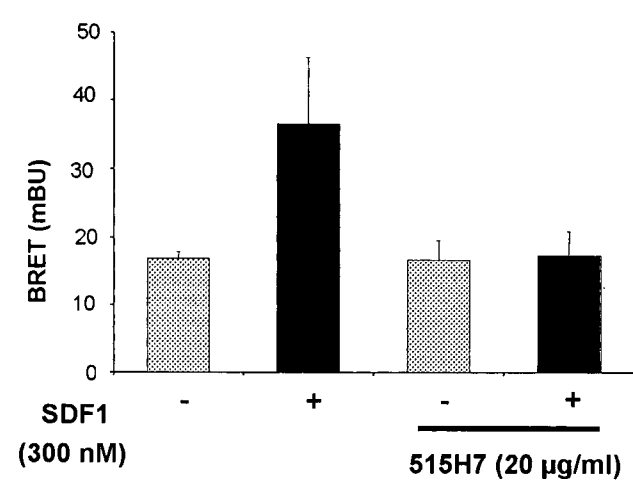


FIGURA 6F

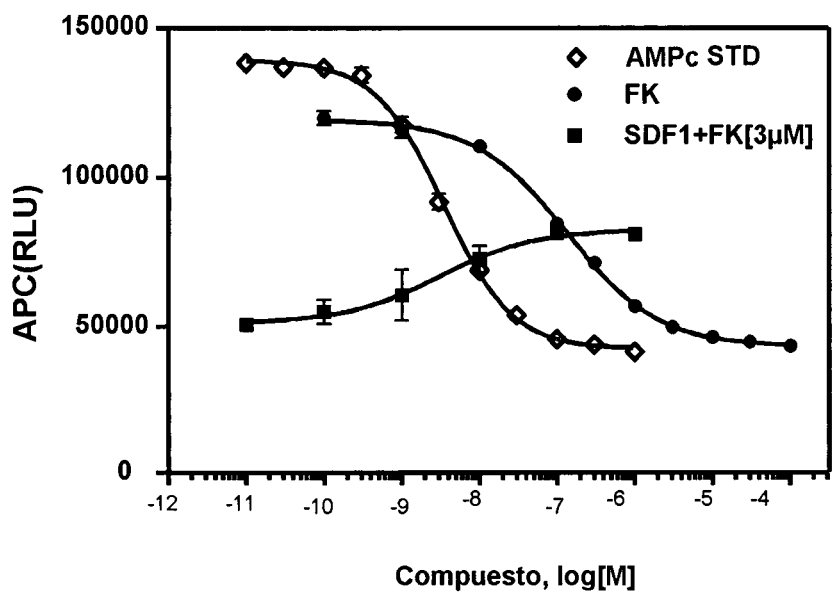


FIGURA 7A

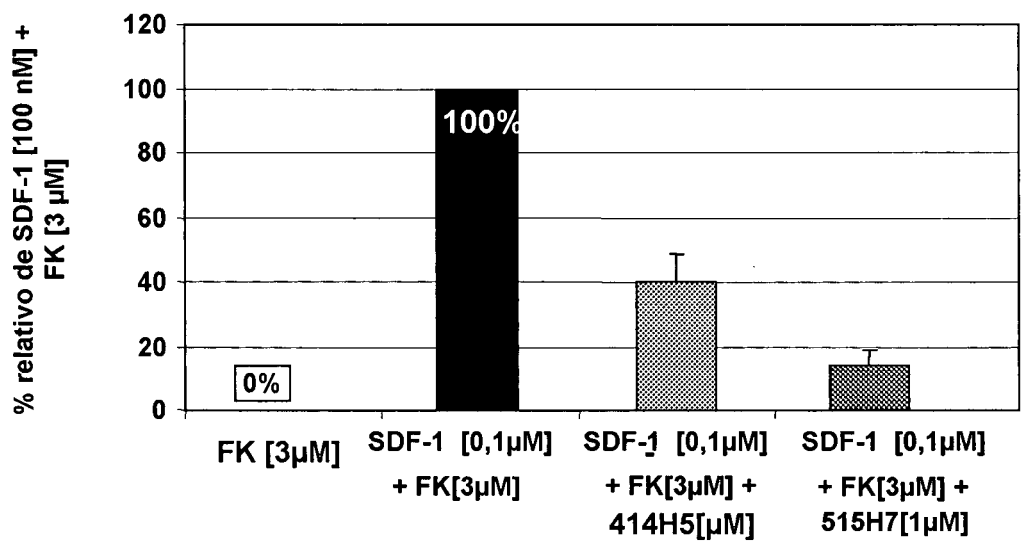


FIGURA 7B

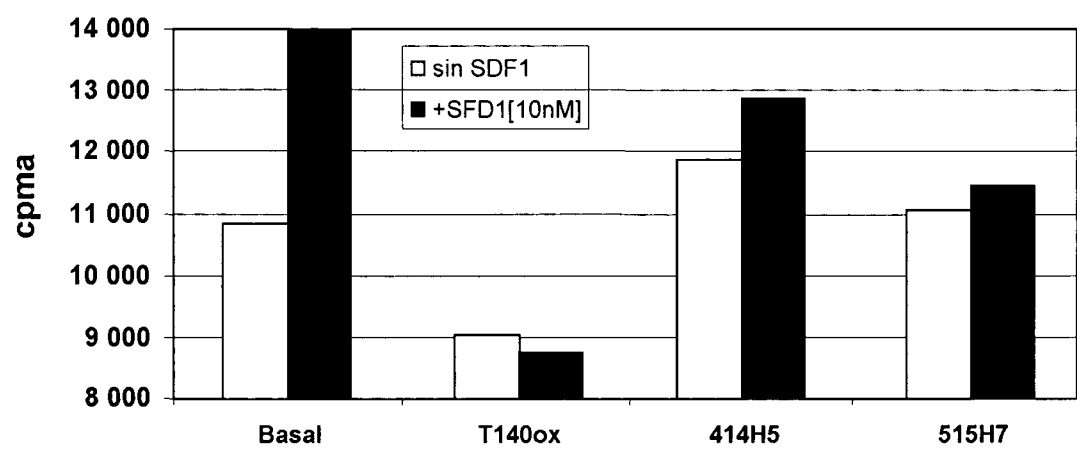


FIGURA 8

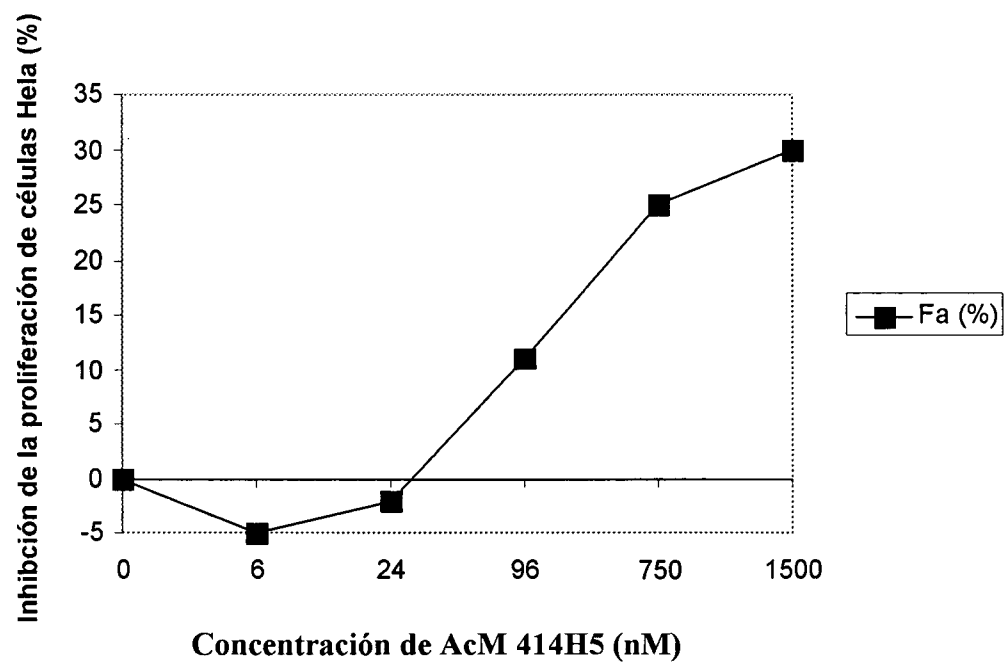


FIGURA 9

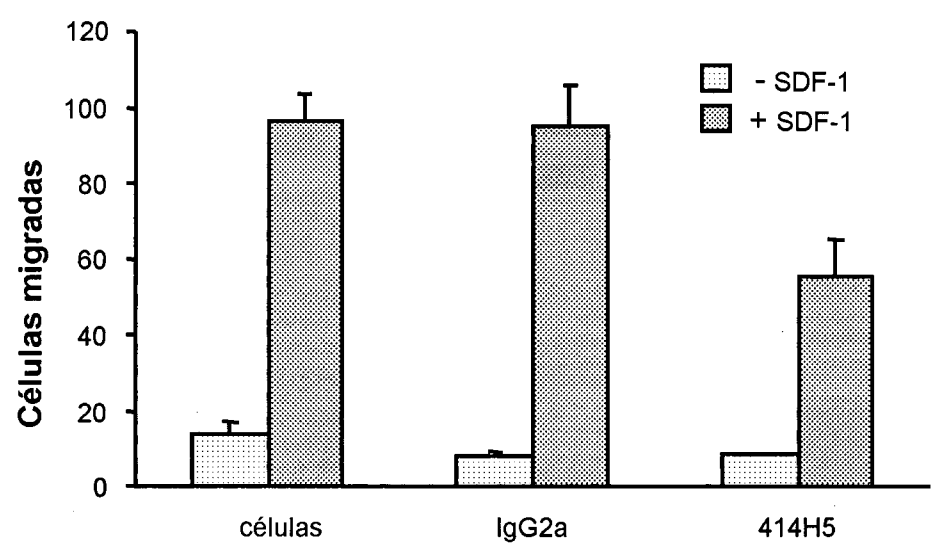


FIGURA 10A

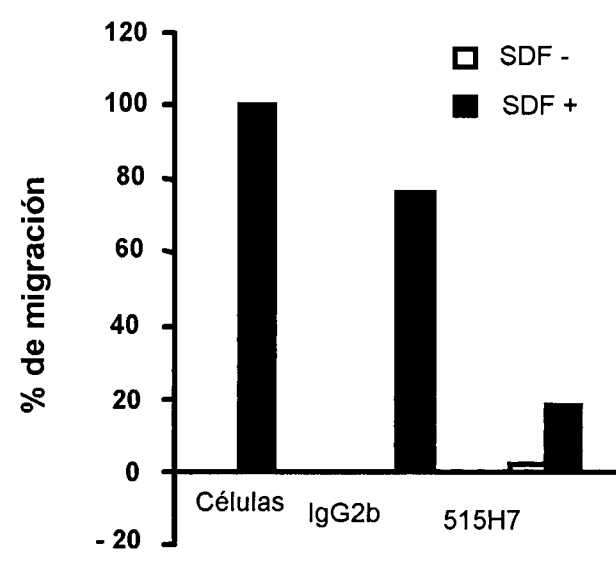
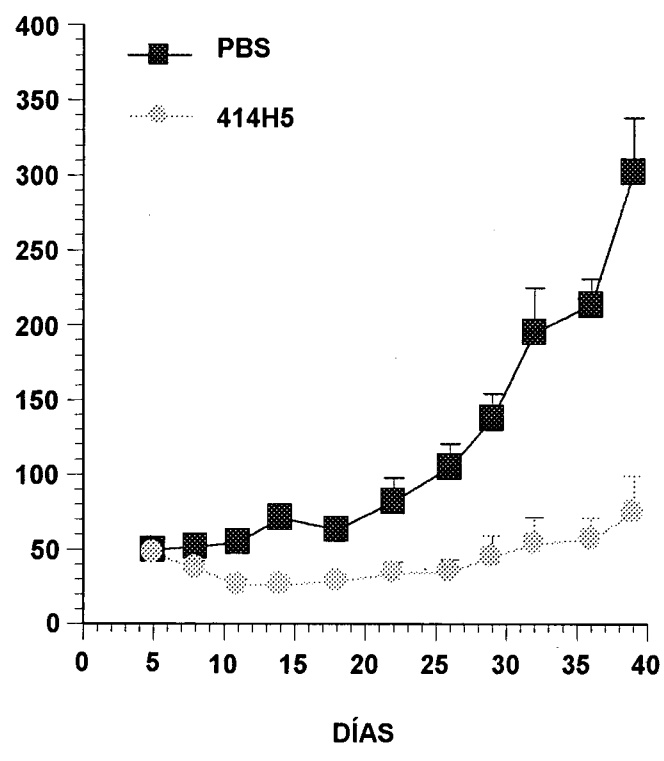


FIGURA 10B

A



B

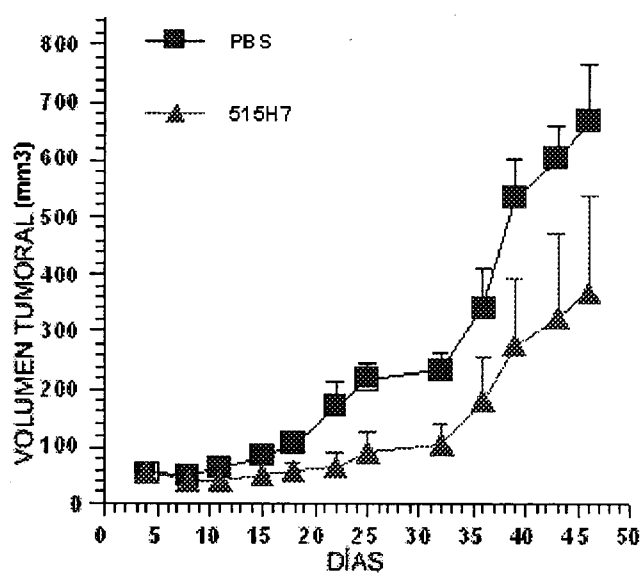


FIGURA 11

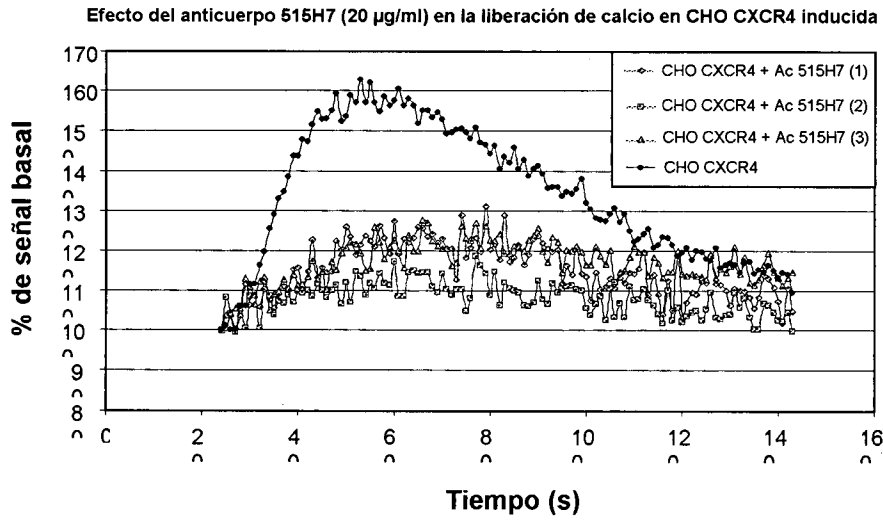


FIGURA 13A

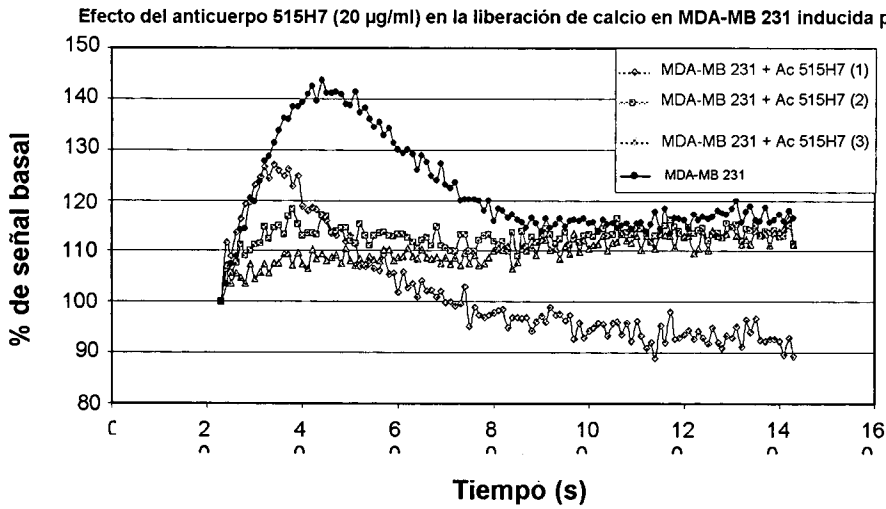


FIGURA 13B

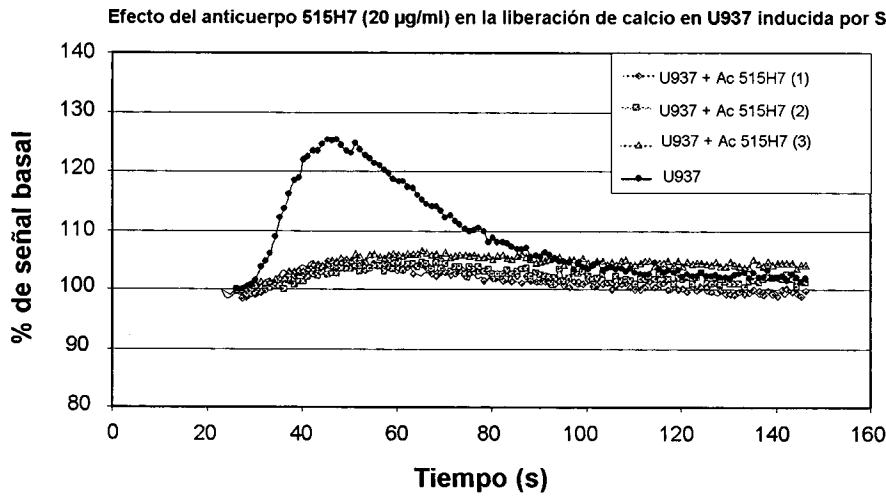


FIGURA 13C

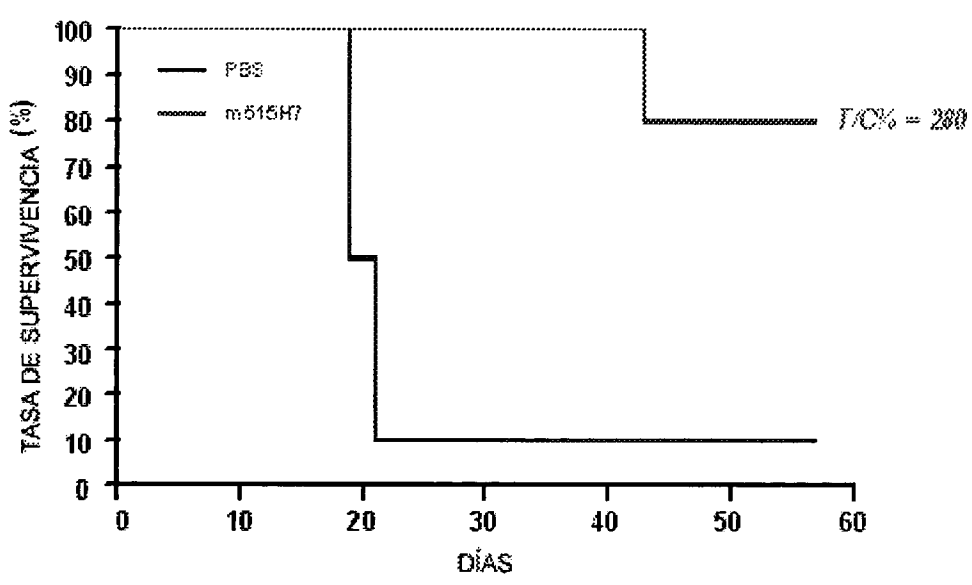


FIGURA 15

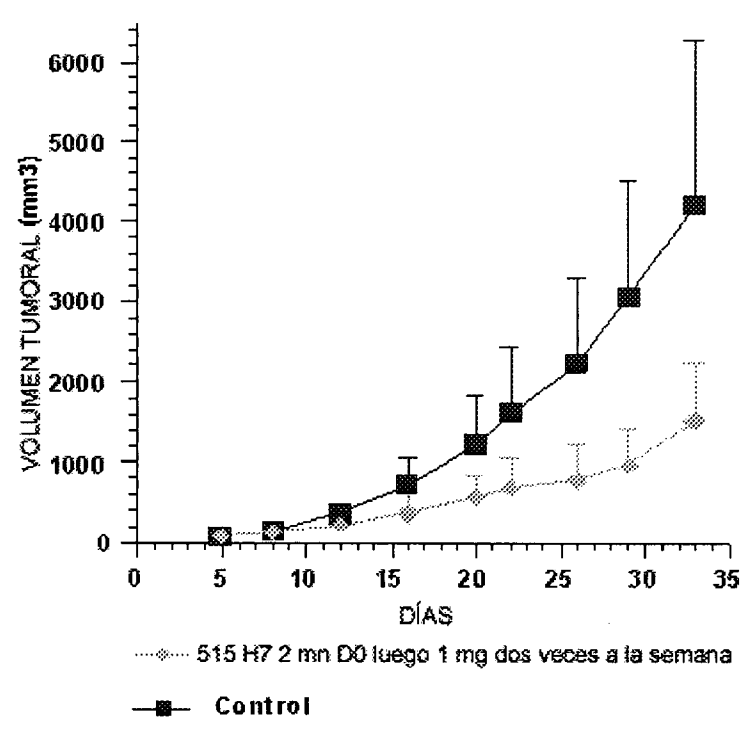


FIGURA 16

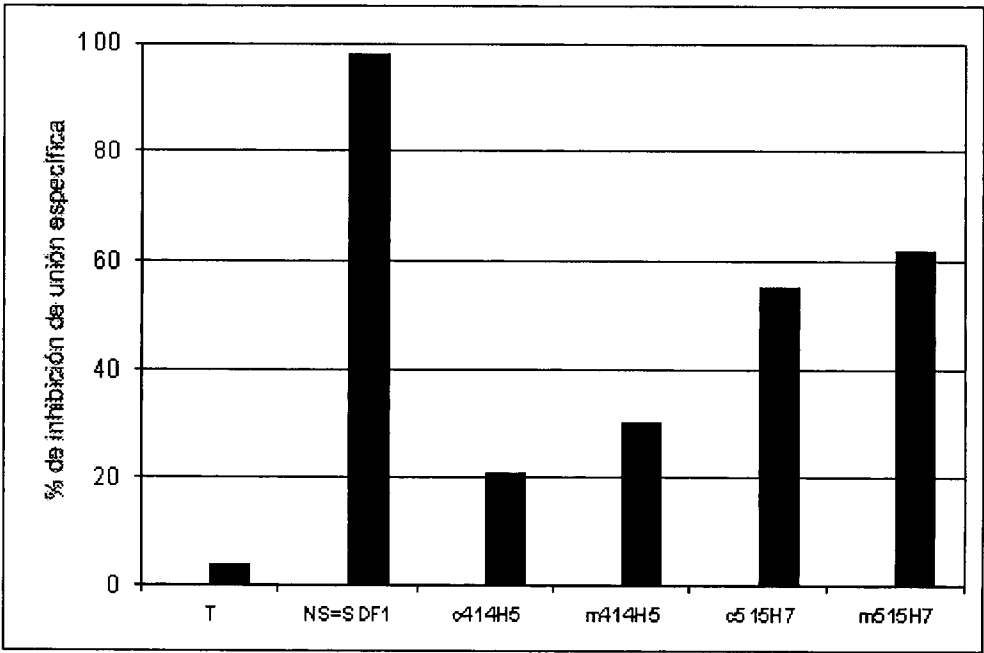


FIGURA 17

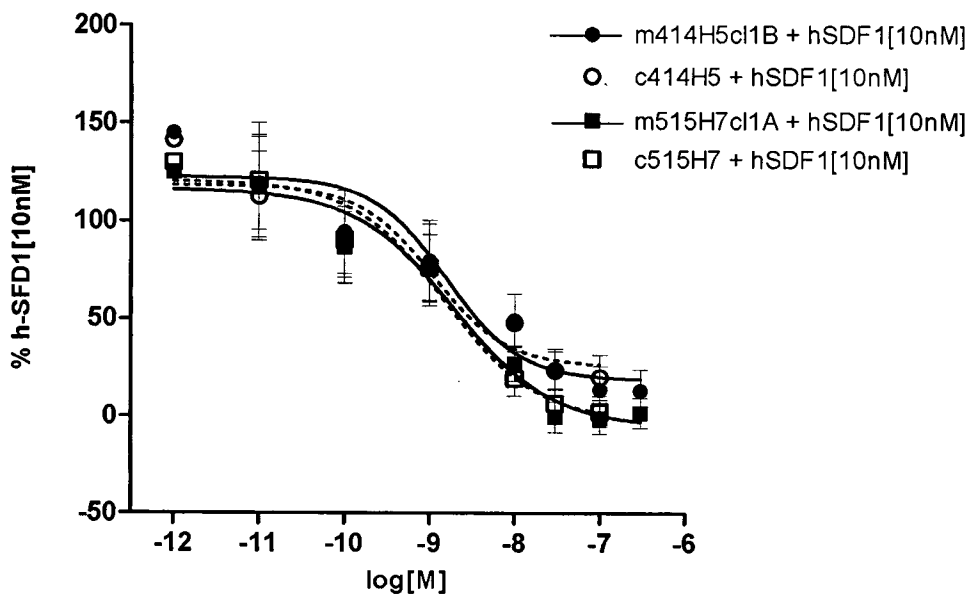


FIGURA 18

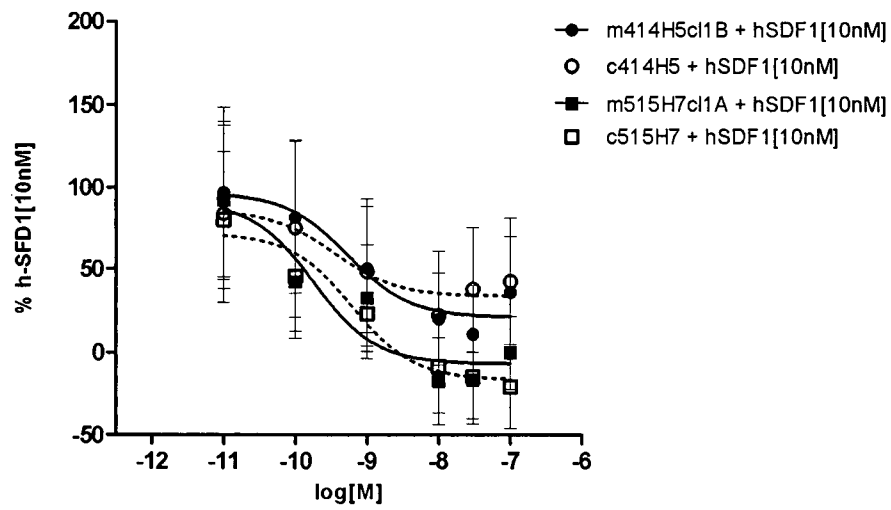


FIGURA 19

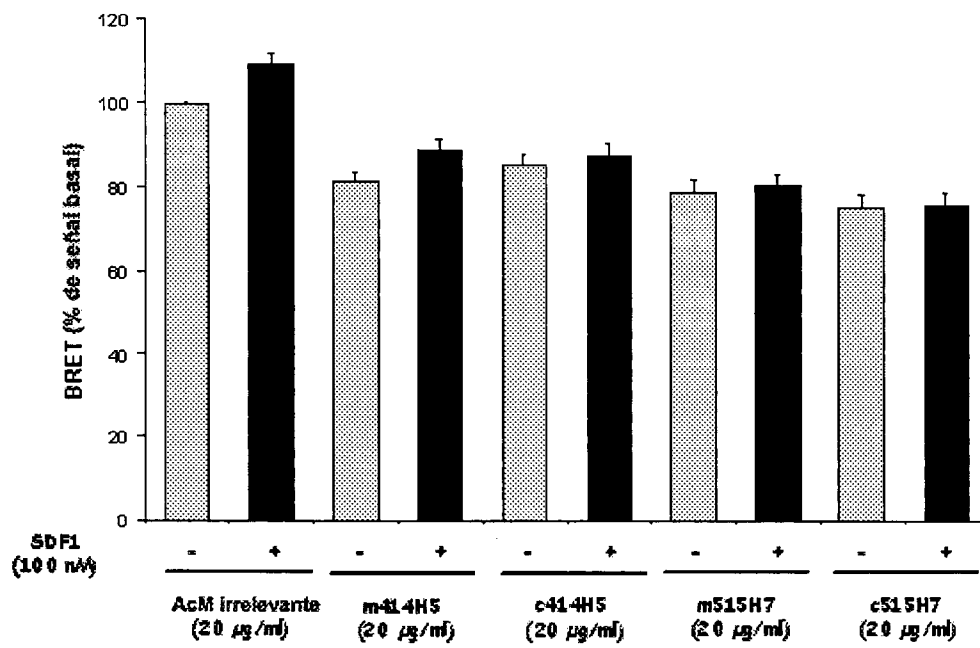


FIGURA 20A

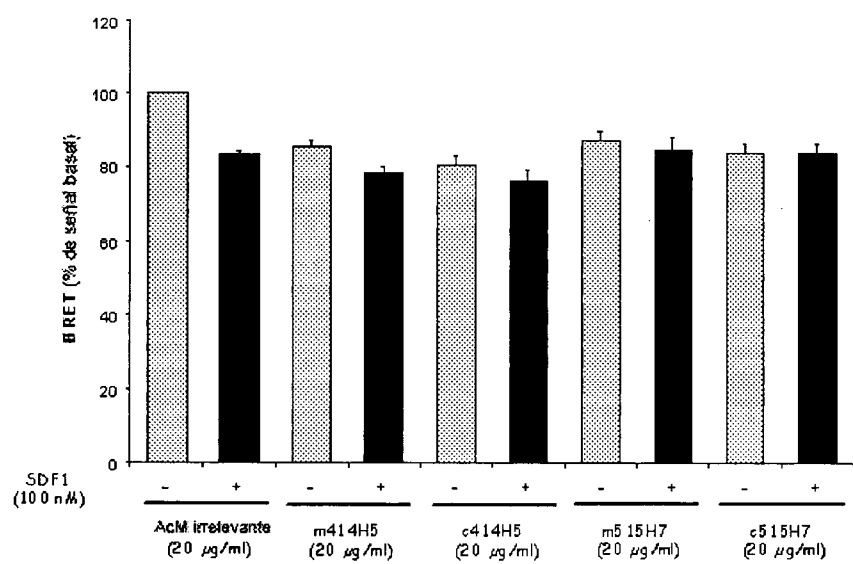


FIGURA 20B

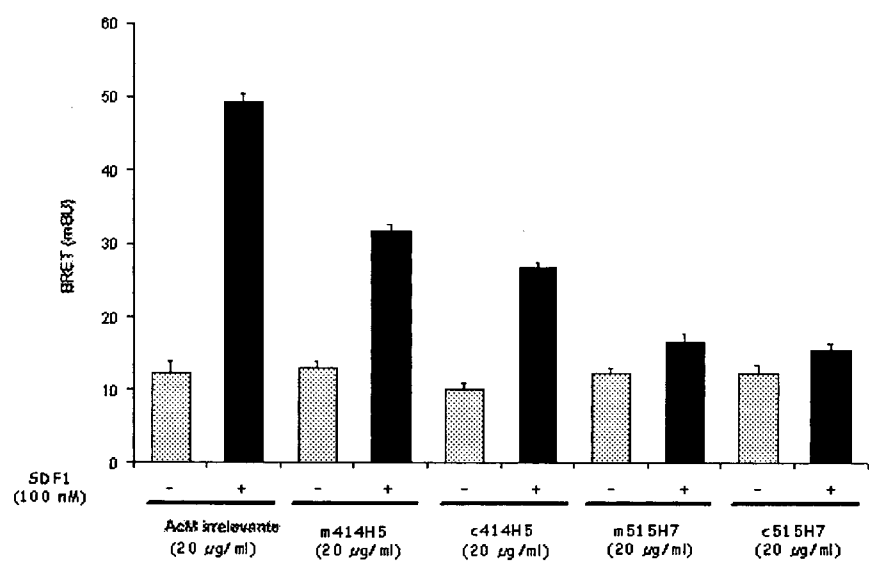


FIGURA 20C

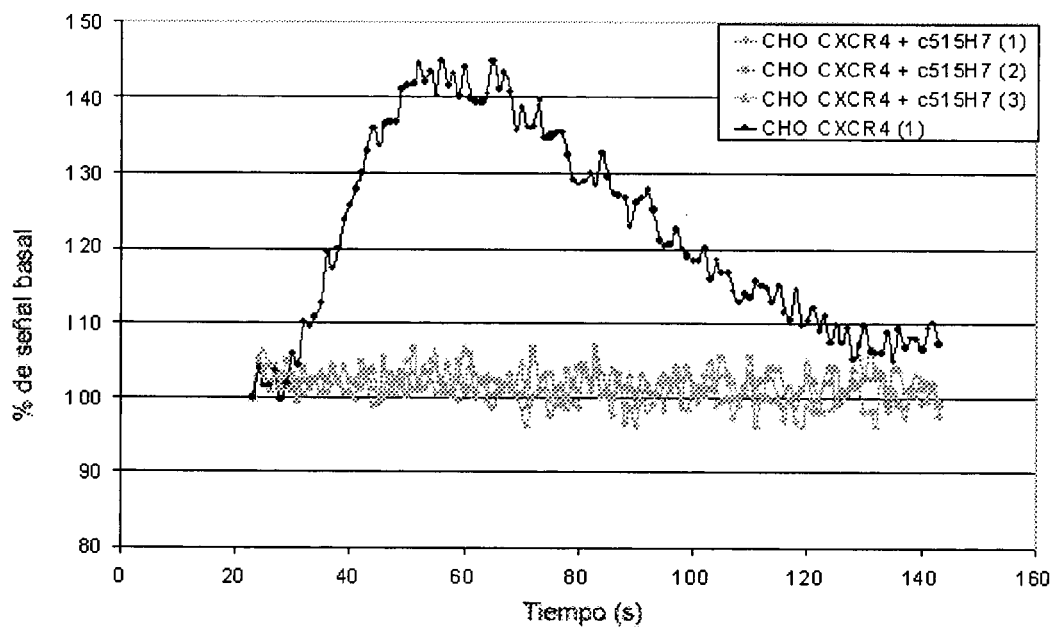


FIGURA 21A

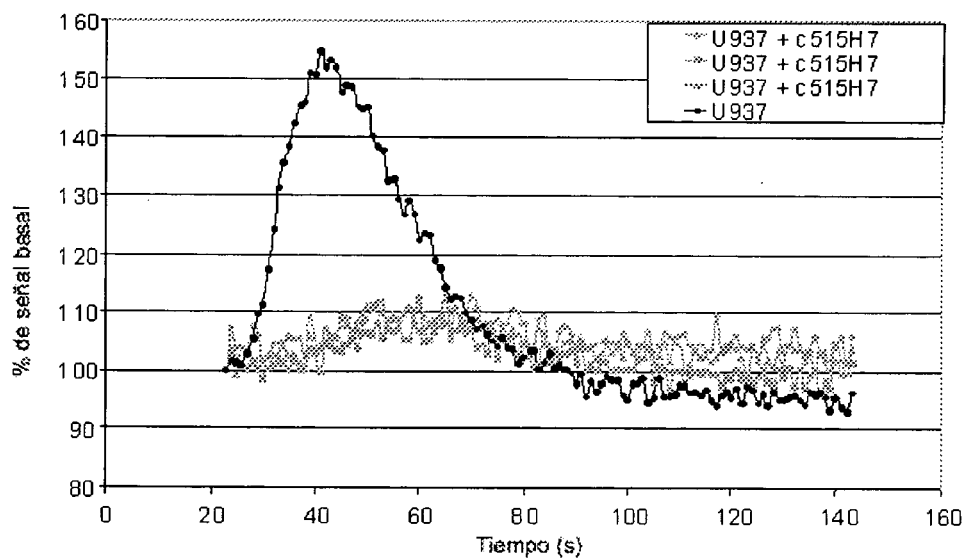


FIGURA 21B

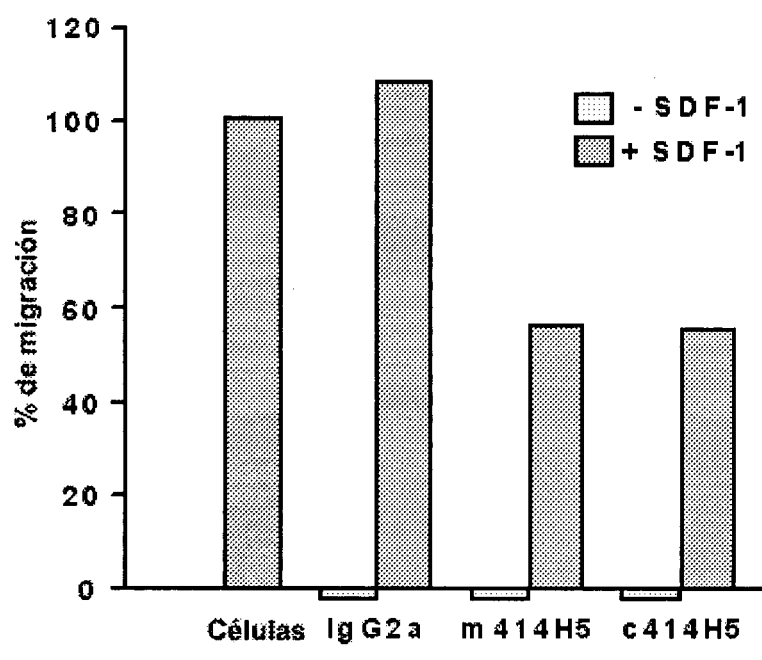


FIGURA 22A

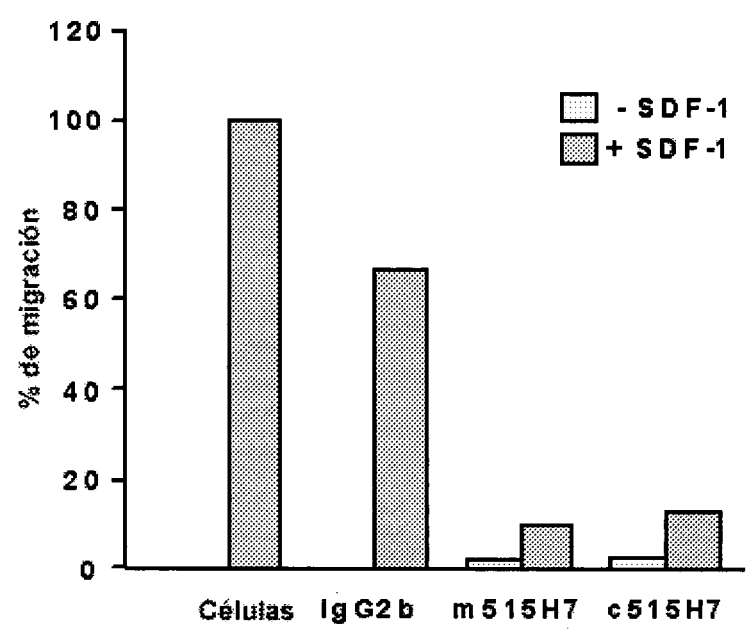


FIGURA 22B

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

El Suscrito.....
En calidad de.....
De.....
Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de.....
con domicilio en.....
Oficinas principales en.....

Nombro(amos) a **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) facuto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en
Hoy.....de.....de 200.....
Firma.....
Nombre.....
Cargo.....

PIERRE FABRE MEDICAMENT
Société Anonyme
17, avenue Jean Moulin - 81106 CASTRES
45, place Abel Gance - 92100 BOULOGNE

POWER OF ATTORNEY

The Undersigned.....**Jean-Pierre COUZINIER**.....
Acting as **Chief Operating Officer**.....
Of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**.....
Company incorporated as per the laws of **France**.....
domiciled in **45, Place Abel Gance**.....
With principal offices in **Castres**.....

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

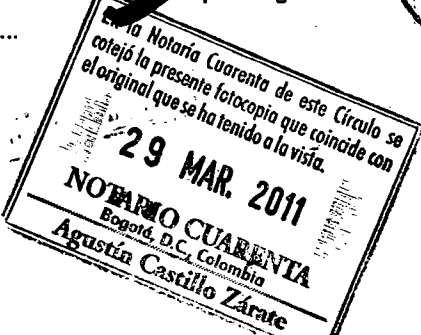
Granted and signed in **Castres**

This.....day of.....November.....

Signature.....

Name **Jean-Pierre COUZINIER**

Title **Chief Operating Officer**



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy.....de.....de.....
personalmente compareció ante mí.....

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él/ella es.....

de.....

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de.....

con fecha.....

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

**CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL**

Hoy.....de.....de.....
compareció(eron) ante mí.....

a quien(es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 3rdday of November.....of 2005.....

personally appeared before me Jean-Pierre COUZINIER

to me, known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the **Chief Operating Officer**.

of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**...

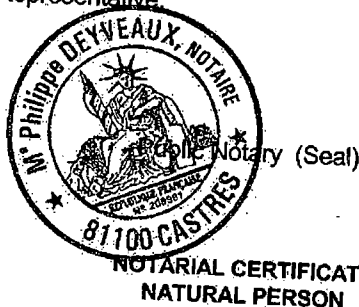
Which is legally constituted for a term not yet expired; that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of France....

under date of November 3rd, 2005.....

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.



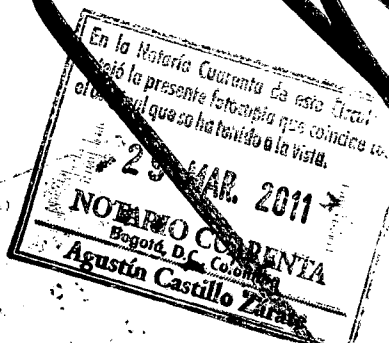
On this.....day of.....of.....
personally appeared before me.....

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **PIERRE
FABRE MEDICAMENT**, domiciliada en **45, Place Abel Gance**.

APOSTILLA

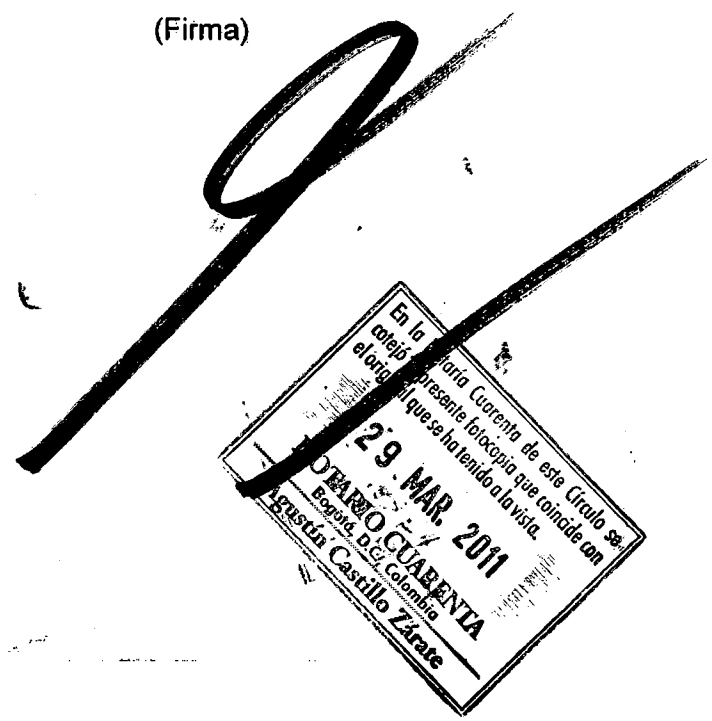
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

- 1. Republica Francesa
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por el Sr. Philippe DÉYVEAUX
- 3. actuando en capacidad de Notario
- 4. lleva el sello de la oficina de CASTRES

Certificado

- 5. en TOLOUSE
- 6. el 14 de noviembre de 2005
- 7. por el Procurador general para la Corte de apelaciones
- 8. No. 7842
- 9. Sello
- 10. Firma

(Firma)



(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par Philippe DEXNEAU

3 - agissant en qualité de Notaire

4 - est revêtu du sceau de Castres

Atteste

14 NOV. 2005

5 - A TOULOUSE

6 - le

7 - Par le procureur général près la cour d'appel

Sous n° 7842

9 - au

10 - Signature



En la Notaria Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

28 MAR 2006

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Augusta Castillo Zárate



No. 11-042011- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 18:14:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 173

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO C

- ☐ 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 INVENCION 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 ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
PIERRE FABRE MEDICAMENT

REFERENCIA	Radicación No.	11 042011
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/62787
	Fecha inicio fase nacional	01/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

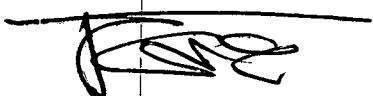
08882

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 Única No.10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

03 JUN 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11