



DELEGATURA PROPIED
División de Nuevas

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-150358-00000-0000

Fecha: 2012-09-03 16:33:52
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 269

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 266

SOLICITU
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO ANTICUERPOS CONTRA CXCR4

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE AFFITECH RESEARCH AS

DOMICILIO OSLO, NORUEGA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

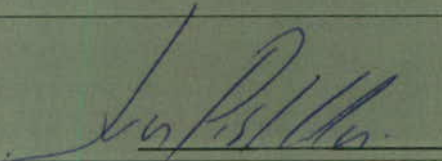
22. SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-150358- -00000-0000 Fecha: 2012-09-03 16:33:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 269 Act. 411 PRESENTACION Folios: 266
---	--

AS. 121.725

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/GB2011/000175	Fecha	10.02.2011
Publicación Internacional No.		WO 2011/098762	Fecha	18.08.2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)			
ANTICUERPOS CONTRA CXCR4				
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. AFFITECH RESEARCH AS				
6	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN		Oslo Research Park, Gaustadalleen 21, N-0349	No. TELÉFONO	
CIUDAD		Oslo	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	NO
PAÍS DE RESIDENCIA		NO		
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS		NOMBRES	NO DE	NACIONALIDAD
1. KAVLIE		Anita		
2. KIPRIJANOV		Sergej, Michailovič		
3.				
4.				
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:				
8	DATOS INVENTOR (ES)			
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. NO			Oslo	Strømsborgveien 39H, N-0287
2. NO			Oslo	Hovseterveien 98, N-0768
3.				
4.				
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.				
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492	
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO	7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. GB		GB	1002238.2	2010.02.10
2. US		US	61/303,060	2010.02.10
3.				

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 12-79236, 12-88393	Fecha: 30.08.2012
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 4-164 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 56 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar: 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 August 2011 (18.08.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/098762 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/GB2011/000175

(22) International Filing Date:

10 February 2011 (10.02.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/303,060 10 February 2010 (10.02.2010) US
1002238.2 10 February 2010 (10.02.2010) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **AF-FITECH RESEARCH AS** [NO/NO]; Oslo Research Park, Gaustadalleen 21, N-0349 Oslo (NO).

(71) Applicant (for BB only): **OWEN, Deborah, Jane** [GB/GB]; Dehns, St Bride's House, 10 Salisbury Square, London, EC4Y 8JD (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **KAVLIE, Anita** [NO/NO]; Strømsborgveien 39H, N-0287 Oslo (NO). **KIPRIJANOV, Sergej, Michailovič** [DE/NO]; Hovseterveien 98, N-0768 Oslo (NO).

(74) Agent: **DEHNS**; St Bride's House, 10 Salisbury Square, London EC4Y 8JD (GB).

(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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))

(88) Date of publication of the international search report:
19 January 2012

(15) Information about Correction:

Previous Correction:

see Notice of 20 October 2011

WO 2011/098762 A3

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST CXCR4

(57) Abstract: The present invention provides antibodies which bind to CXC chemokine receptor (4) (CXCR4) and which do not induce significant apoptosis of CXCR4 expressing cells. Also provided are *inter alia* immunoconjugates and compositions comprising such antibodies and methods and uses involving such antibodies, particularly in the medical and diagnostic fields.

ANTICUERPOS CONTRA CXCR4

Descripción de la Invención

La presente invención se refiere en general a los campos de anticuerpos, biología CXCR4 y terapias relacionadas. Más particularmente, proporciona anticuerpos que se unen a CXCR4. Tales anticuerpos anti-CXCR4 tienen usos diagnósticos y terapéuticos en enfermedades y afecciones asociadas con CXCR4, tales como el tratamiento de cáncer e infecciones virales, específicamente VIH, en tratamiento de enfermedades inflamatorias e inmunitarias, el monitoreo y el pronóstico del crecimiento y avance del tumor, por ejemplo, mediante la formación de imágenes de los vasos sanguíneos de tumor, inhibiendo o reduciendo la formación de metástasis e inhibiendo o reduciendo la angiogénesis. Las composiciones y métodos con base en el anticuerpo de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y otras combinaciones, kits y métodos terapéuticos.

Con más de 800 miembros, los receptores acoplados a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) representan la familia más grande de moléculas de superficie celular involucradas en la transmisión de señal, representando >2% de los genes totales codificados por el genoma humano. Los miembros de la superfamilia GPCR comparten una topología de membrana común: un N-terminal extracelular, y un C-terminal intracelular y siete hélices de transmembrana (TM), que se conectan a través de tres ciclos intracelulares y tres ciclos extracelulares. Sobre las bases de su estructura topológica compartida, los GPCR también son referidos como siete receptores de transmembrana (7TM). Estos receptores controlan las funciones fisiológicas clave, incluyendo la neurotransmisión, la liberación de hormonas y enzimas de glándulas endocrinas y exócrinas, las respuestas inmunitarias, la contracción del músculo cardíaco y liso, y la regulación de la presión sanguínea. Su disfunción contribuye a algunas de las enfermedades humanas más prevalentes. El surgimiento de datos experimentales y clínicos indica que los GPCR tienen un papel crucial en el avance y la metástasis del cáncer. Por lo tanto, existe la posibilidad de que algunos GPCR puedan ser objetivos adecuados para fármacos anticancerígenos.

Las quimiocinas juegan un papel importante *inter alia* en respuestas inmunitarias e inflamatorias en varias enfermedades y trastornos, que incluyen cáncer, infecciones virales, asma y enfermedades alérgicas, así como patologías autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y aterosclerosis. Dependiendo de

su estructura, las quimiocinas se clasifican como quimiocinas C-C (que contienen un motivo de cisteína-cisteína) o quimiocinas C-X-C (que contienen un motivo de cisteína-X-cisteína). Los receptores que unen tales quimiocinas de esta forma se clasifican como miembros de las familias CCR o CXCR, respectivamente.

CXCR4 (también denominado fusina, HM89, LESTR, HUMSTR) es un receptor alfa-quimiocina específico del factor 1 derivado de la estroma (SDF-1, también denominado CXCL12 y PBSF), una molécula dotada con una potente actividad quimiotáctica para linfocitos. Este receptor es uno de varios receptores de quimiocina que aíslan VIH y pueden utilizarse para infectar células T CD4⁺. Varios tejidos normales se expresan CXCR4. Los ejemplos notables de células en donde la expresión ha sido demostrada, tanto en el término ARNm y la proteína funcional, incluyendo: células hematopoyéticas/células progenitoras de la médula espinal, células del sistema inmunitario, por ejemplo, células T, células pre-B y de plasma, células dendríticas, células NK; otras células sanguíneas, por ejemplo monocitos, mastocitos, plaquetas; células del sistema nervioso, por ejemplo, neuronas, astrocitos, microglía; otras células, por ejemplo, células endoteliales, células del músculo liso vascular, del epitelio gastrointestinal y otras ciertas células epiteliales.

CXCR4 se expresa en una variedad de tumores y juega un papel decisivo en la patofisiología del cáncer, particularmente en la metástasis del cáncer (Dorsam and Gutkind, 2007, G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 79-94). La expresión de CXCR4 se ha encontrado en casi todos tumores estudiados. También es de interés que SDF-1 se expresa a niveles particularmente altos en el hígado, los pulmones, la médula espinal, los nodos linfoides, y (en cierta forma en niveles inferiores) en el cerebro, es decir, sitios en los cuales los cánceres típicamente se convierten en metástasis. Las indicaciones potenciales para un agente tal como un anticuerpo que activa CXCR4 incluyen cánceres (por ejemplo, cánceres metastáticos), por ejemplo, de pecho, de próstata, páncreas, esófago, colorectal, hígado y pulmón (tanto SCLC y NSCLC), así como melanoma maligno o metastático, tumores cerebrales (glioma), cáncer de cabeza y cuello, ciertas leucemias, linfomas tales como el linfoma no de Hodgkins, tumores en los niños (por ejemplo, neuroblastoma), cáncer renal, hemangioblastoma. El CXCR4 sobre-expresado se ha encontrado en varios otros cánceres, que incluyen tumores de pulmón, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer ovárico, cáncer cervical, carcinomas de tiroides papilar, osteosarcomas, y otras malignidades. Un anticuerpo anti-CXCR4 también puede

utilizarse para el tratamiento de infecciones virales tales como VIH u otras infecciones retrovirales, y en el tratamiento de enfermedades inmunitarias tales como las enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y en la inhibición de la angiogénesis y la vascularización.

Debido a sus complejas estructuras, los GPCR se consideran como “objetivos difíciles” para producir anticuerpos específicos. No pueden ni purificarse fácilmente de la fracción de membrana de células lisadas, ni se pueden producir recombinantemente en diferentes sistemas de expresión ya que las proteínas solubles se pliegan correctamente.

Las dificultades asociadas con la generación de anticuerpos contra GPCR se establecen en Hoogenboom y otros Eur. J. Biochem 260, 774-784 (1999). Además, Sui y otros Eur. J. Biochem 270, 4497-4506 (2003) explican las dificultades asociadas con tratar de obtener anticuerpos humanos contra CXCR4 receptor de quimiocina GPCR y reportan que aún utilizando el método explorador combinado con la selección en retroceso no han podido identificarse anticuerpos específicos. De esta forma, en el campo del GPCR, la generación de anticuerpos específicos permanece como un reto principal.

Northwest Biotherapeutics Inc. está desarrollando anticuerpos monoclonales contra CXCR4, algunos de los cuales están en un desarrollo preclínico en etapa final. Los datos sugieren la eficacia potencial de los anticuerpos CXCR4 que se obtuvieron de modelos en animales a través de NWB y otros. El desarrollo posterior puede incluir la humanización de anticuerpos seleccionados y estudios de toxicidad en la preparación de ensayos clínicos de la Fase I.

MDX-1338 es un anticuerpo monoclonal completamente humano, específico de CXCR4 anti-humano de Medarex. Los estudios *in vitro* demostraron que MDX-1338 se une a las células que expresan CXCR4 con una baja afinidad nanomolar. MDX-1338 bloquea al ligando CXCL12 que se une a las células que expresan CXCR4 e inhibe la migración inducida por CXCL12 y el flujo de calcio con valores EC_{50} nanomolares bajos. MDX-1338 es un IgG4, y de esta forma carece de la actividad de ADCC y CDC. MDX-1338 induce la apoptosis en el intervalo de las líneas de células que expresan CXCR4 y también tiene actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjerto tumorales de AML múltiple y linfoma.

Además, existe un número de compuestos de células pequeñas y péptidos en diferentes etapas de desarrollo que activan CXCR4/SDF-1.

Los inventores han reconocido que la identificación de anticuerpos

adicionales que reconocen CXCR4 sería benéfica en la expansión del número de opciones terapéuticas. Como se explica anteriormente, sin embargo, la naturaleza de los GPCR tal como CXCR4 significa que el desarrollo de tales anticuerpos posee retos reales.

En particular, existe una necesidad de anticuerpos humanos para CXCR4 que reconocen CXCR4 en su forma unida de membrana nativa. Aunque los anticuerpos humanos generalmente se reconoce que despliegan ventajas, se sabe que el desarrollo de los anticuerpos humanos que tienen afinidades lo suficientemente altas y las propiedades funcionales apropiadas para convertirlos en candidatos para terapia humana exitosa es a través de medios no directos. Esto se presenta aún más en el caso del GPCR, debido a su naturaleza compleja y de transmembrana.

La presente invención supera ciertas imitaciones de la técnica anterior proporcionando nuevas composiciones y métodos terapéuticos para utilizarse en el tratamiento seguro y efectivo de tumores, infecciones virales y otras enfermedades y afecciones en donde las células CXCR4+ están involucradas, tales como los trastornos inflamatorios o inmunitarios. La invención proporciona anticuerpos que se unen a CXCR4, preferiblemente a un epítipo dentro de uno o más dominios extracelulares de CXCR4, particularmente anticuerpos humanos. Tales anticuerpos son efectivos en el tratamiento de tumores e infecciones virales y otras enfermedades y trastornos en donde las células CXCR4+ están involucradas, tales como trastornos inflamatorios inmunitarios. Las composiciones y métodos de la invención también se extienden al uso de inmunoconjugados y combinaciones que utilizan esta categoría particular de anticuerpos.

Una ventaja particular de los anticuerpos de la presente invención es que los anticuerpos no inducen una apoptosis significativa de las células que expresan CXCR4. Esto está en contraste con anticuerpos principales en el campo clínico (por ejemplo, los anticuerpos Medarex como se describe en WO 2008/060367), que inducen tal apoptosis. Como CXCR4 se expresa en un número significativo de células normales, esto carece de inducción de apoptosis en una ventaja terapéutica real para evitar la muy alta aniquilación de células indeseadas y tales anticuerpos de esta forma tienen un perfil de seguridad favorable.

Una propiedad preferible adicional o alternativa de los anticuerpos de la invención descritos en la presente es que los anticuerpos son anticuerpos antagónicos. De esta forma la propiedad de no inducir apoptosis significativa preferiblemente también se combina con la propiedad de que los anticuerpos son

anticuerpos antagónicos, es decir, bloquean o inhiben la función de CXCR4, a través de por ejemplo muestreando el bloqueo o la inhibición de la interacción de receptor-ligando y/o bloqueando o inhibiendo los eventos de señalización en corriente abajo del receptor CXCR4, por ejemplo, bloqueando o inhibiendo la señalización mediada o inducida por el ligando a través de CXCR4. Esta propiedad es importante para el uso de los anticuerpos en terapia según opuesto a su uso meramente para la marcación de células que expresan CXCR4, por ejemplo, para diagnóstico.

A este respecto, se sabe que CXCR4 se expresa en un amplio intervalo de células sanas/normales y que ambos CXCR4 y su ligando SDF-1 son importantes en el desarrollo. Sin embargo, como se explica anteriormente, también se ha demostrado que CXCR4 se sobre-expresa en la mayor parte de todos los tumores malignos, y contribuye a su crecimiento. Quizás aún más de manera importante, SDF-1 usualmente se expresa fuertemente en aquellos tejidos que es más probable que lleven metástasis, tales como los nodos linfoides, médula espinal, pulmón, hígado, etc., y es ampliamente aceptado que las células tumorales migran a lo largo de un gradiente SDF-1. El propósito principal de los anticuerpos de la invención por consiguiente es limitar el crecimiento del tumor y evitar la formación de metástasis mediante la inhibición de la función de CXCR4, por ejemplo, bloqueando o inhibiendo la interacción de receptor-ligando. CXCR4 también se cree que está involucrado en la angiogénesis, de esta forma bloquea o inhibe la función de CXCR4 que también puede utilizarse para efectuar la angiogénesis y la vascularización tumoral.

El bloqueo o la inhibición de la función, en particular mediante el bloqueo o la inhibición de la interacción del receptor-ligando, también es importante en el uso de anticuerpos de la invención para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. De nuevo, el objetivo principal no es aniquilar las células CXCR4+, sino regular de manera descendente su actividad (en enfermedades autoinmunitarias) y evitar o reducir la migración de las células CXCR4+ a sitios de inflamación (útil tanto en enfermedades inflamatorias como autoinmunitarias).

La actividad antagónica (bloqueo o inhibición de la función de CXCR4) también es importante en el uso de anticuerpos de la invención para tratar infecciones, por ejemplo, infecciones virales, bacterianas, fúngicas o parasíticas en donde CXCR4 juega un papel funcional. Los ejemplos de tales infecciones virales son infecciones retrovirales, y en particular VIH, en donde

algunas cepas (cepas trópicas CXCR4) han demostrado que utilizan al receptor CXCR4 para infectar células hospederas. De esta forma, el bloqueo o inhibición del receptor CXCR4 puede limitar la diseminación de VIH, por ejemplo, mediante el bloqueo o la inhibición de la infección de células CXCR4+ por VIH.

A pesar de esto, como se explica anteriormente, se cree que el modo principal de acción de los anticuerpos de la invención es a través de sus propiedades antagónicas (ventajosamente combinada con su habilidad de no inducir apoptosis significativa de células CXCR4+), en algunas modalidades los anticuerpos de la invención son capaces de inducir la eliminación selectiva (aniquilación) de células CXCR4+. Tal eliminación selectiva puede ser a través de mecanismos tales como ADCC, CDC, o la inducción de una catástrofe mitótica (en particular en la división de células tales como células de tumor) pero parece que no involucra la inducción de apoptosis significativa.

Los inventores de la presente han preparado anticuerpos específicos CXCR4 que se unen a CXCR4.

Por ejemplo, los anticuerpos se unen a células CXCR4+, tales como células transfectadas con CXCR4 y células que naturalmente expresan CXCR4. En particular, los anticuerpos se unen a células HEK293T, transfectadas con CXCR4, las células DT40 transfectadas con CXCR4 y Ramos (células B), Jurkat (leucemia de célula T) y CCRF-CEM (leucemia de célula T humana) que naturalmente expresan CXCR4 (ver Ejemplos 2, 3 y 4).

De manera importante, los anticuerpos no se unen específicamente a células CXCR4, es decir, células que no expresan CXCR4. En particular, los anticuerpos no se unen específicamente a células transfectadas no CXCR4, o a células que naturalmente no expresan CXCR4.

Los anticuerpos también inhiben la unión de los ligandos que se sabe que se unen a CXCR4, por ejemplo, el ligando natural SDF-1a (también referido en la presente como SDF-1) y/u otros ligandos (por ejemplo, ligandos no nativos) que se unen a CXCR4, tal como AMD-3100 (un compuesto químico con muy alta especificidad para CXCR4 y que inhibe CXCR4) (ver Ejemplo 3).

De esta forma, los anticuerpos descritos en la presente se unen específicamente a CXCR4, convirtiéndolos en candidatos adecuados para diagnósticos y terapia de las afecciones explicadas en la presente.

Las secuencias de aminoácido y/o de ADN de las moléculas de anticuerpo preferidas de la invención que se unen a CXCR4, sus dominios V_H y V_L incluyendo regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en

inglés), se explican en varias SEC ID NOs. enumeradas en la presente

De esta forma, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene una propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo antagónico que bloquea o inhibe una o más de las funciones de CXCR4, por ejemplo, bloquea o inhibe la unión de SDF-1 (u otro ligando CXCR4 tal como AMD-3100) a CXCR4, bloquea o inhibe la migración de células CXCR4+ en respuesta a SDF-1 (u otro ligando CXCR4), bloquea o inhibe el flujo de Ca^{2+} inducido por la adición de SDF-1 (u otro ligando CXCR4) a células CXCR4+, o bloquea o inhibe cualesquiera otros eventos de señalización en corriente abajo del receptor CXCR4.

Preferiblemente, el anticuerpo se aísla. También preferiblemente, el anticuerpo es humano y/o el CXCR4 es preferiblemente humano. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4. De esta forma, cualquier referencia a "unión a CXCR4" incluye una modalidad preferida de "la unión a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4". Otras propiedades preferidas de los anticuerpos de la invención son uno o más de la habilidad de inducir ADCC de células que expresan CXCR4 (células CXCR4+), la habilidad de inducir CDC de células que expresan CXCR4 y la habilidad de unirse a por lo menos un CXCR4 humano, más preferiblemente a CXCR4 humano y de mono o a CXCR4 de humano y ratón, más preferiblemente a CXCR4 de humano, ratón y mono. Cuando se observa una reactividad de especie cruzada, aún más preferiblemente los anticuerpos se unen a CXCR4 de humano y mono, o de humano y ratón con afinidades similares. Preferiblemente los anticuerpos de la invención despliegan actividad anti-tumoral, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de las células tumorales, *in vivo*.

De esta forma, la invención preferiblemente provee un anticuerpo humano aislado que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4. De esta forma, en todas las modalidades descritas en la presente, la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 es una característica preferida.

En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, 7, 13, o 19,

o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

Alternativamente o además de, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, 8, 14, o 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

Alternativamente o además de, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, 9, 15 ó 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

Alternativamente o además de, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, 10, 16, 22 ó 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

Alternativamente o además de, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, 11, 17, 23, o 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

Alternativamente o además de, en una modalidad de la invención, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, 12, 18, 24 ó 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de estas secuencias.

De esta forma, en ciertas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende uno o más dominios CDR de cadena pesada, en donde el dominio CDR de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, 7, 13, o 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, 8, 14, o 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, 9, 15 ó 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

La invención también proporciona, en ciertas modalidades un anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende uno o más dominios CDR de cadena ligera, en donde el dominio CDR de cadena ligera se selecciona del grupo que consiste de:

(a) un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, 10, 16, 22 ó 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(b) un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, 11, 17, 23 ó 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(c) un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, 12, 18, 24 ó 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende ambas:

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Más preferiblemente, un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también está presente.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende ambas:

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Más preferiblemente, un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también está presente.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende ambas:

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Más preferiblemente, un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también está presente.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende ambas:

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Más preferiblemente, un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también está presente.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprende ambas:

(a) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(b) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Más preferiblemente, un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, también está presente.

En una modalidad preferida, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En una modalidad preferida, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En una modalidad preferida, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente homóloga a la

misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En una modalidad preferida, la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

En aún otra modalidad preferida, la CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, están presentes individualmente o en combinación.

Visto alternativamente, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma y/o un

dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14,

o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de

SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Visto alternativamente, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11; o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un

anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Visto alternativamente, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Visto alternativamente, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo para unirse a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un

dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Visto alternativamente, en ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9,

o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de

SEC ID NO: 20, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Tal anticuerpo opcionalmente además comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o además comprende un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23 y 24, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Ciertos anticuerpos preferidos de la invención comprenden una o

más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste de SEC ID NOs: 1, 2, 3, 88, 89 y 90, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Ciertos anticuerpos preferidos comprenden dos o más de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 4, 5 y 6; o 10, 11 y 12; o 16, 17 y 18; o 22, 23 y 24; o 88, 89 y 90, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Las moléculas de unión especialmente preferidas comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 4, 5 y 6; o 10, 11 y 12; o 16, 17 y 18; o 22, 23 y 24; o 88, 89 y 90, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Otros ciertos anticuerpos preferidos comprenden dos o más de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 y 3; o 7, 8 y 9; o 13, 14 y 15; o 19, 20 y 21, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores.

Los anticuerpos especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 y 3; o 7, 8 y 9; o 13, 14 y 15; o 19, 20 y 21, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las SEC ID NOs anteriores (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 4, 5 y 6, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 y 3, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 10, 11 y 12, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o

secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 7, 8 y 9, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 16, 17 y 18, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 13, 14 y 15, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 22, 23 y 24, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 19, 20 y 21, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos más especialmente preferidos comprenden 3 de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 88, 89 y 90, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas), y 3 de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 y 3, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de estas secuencias (es decir, una de cada una de las CDR1 y CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas).

Ciertos anticuerpos específicos preferidos comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 1, un dominio CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 2, y un dominio CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 3, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes

mencionadas; y/o comprenden un dominio CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 4, un dominio CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 5, y un dominio CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 6, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

Ciertos anticuerpos específicos preferidos comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 7, un dominio CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 8, y un dominio CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 9, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas; y/o comprenden un dominio CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 10, un dominio CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 11, y un dominio CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 12, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

Ciertos anticuerpos específicos preferidos comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 13, un dominio CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 14, y un dominio CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 15, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas; y/o comprenden un dominio CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 16, un dominio CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 17, y un dominio CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 18, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

Ciertos anticuerpos específicos preferidos comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 19, un dominio CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 20, y un dominio CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 21, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas; y/o comprenden un dominio CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 22, un dominio CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 23, y un dominio CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 24, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

Ciertos anticuerpos específicos preferidos comprenden un dominio CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 1, un dominio CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 2, y un dominio CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 3, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas; y/o comprenden un dominio CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 88, un dominio CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 89, y un dominio CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 90, o secuencias sustancialmente homólogas a cualquiera de las secuencias antes mencionadas.

En una modalidad más, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

- (i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1,
- (ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, y
- (iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3.

En un aspecto preferido de esta modalidad, una o más de las CDR de región variable de cadena ligera son seleccionadas del grupo que consiste de:

- (i) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4,
- (ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5, y
- (iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6. Preferiblemente, 2 ó 3 de tales CDR de región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo anterior. Los anticuerpos que comprenden secuencias que son sustancialmente homólogas a una o más de las secuencias antes mencionadas también son provistos en esta modalidad.

En una modalidad más, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

- (i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7,
- (ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8, y
- (iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9.

En un aspecto preferido de esta modalidad, una o más de las CDR

de región variable de cadena ligera son seleccionadas del grupo que consiste de:

(i) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10,

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11, y

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12. Preferiblemente, 2 ó 3 de tales CDR de región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo anterior. Los anticuerpos que comprenden secuencias que son sustancialmente homólogas a una o más de las secuencias antes mencionadas también son provistos en esta modalidad.

En una modalidad más, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13,

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14, y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15.

En un aspecto preferido de esta modalidad, una o más de las CDR de región variable de cadena ligera son seleccionadas del grupo que consiste de:

(i) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16,

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17, y

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18. Preferiblemente, 2 ó 3 de tales CDR de región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo anterior. Los anticuerpos que comprenden secuencias que son sustancialmente homólogas a una o más de las secuencias antes mencionadas también son provistos en esta modalidad.

En una modalidad más, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprende por lo menos una región variable

de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

- (i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19,
- (ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20, y
- (iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21.

En un aspecto preferido de esta modalidad, una o más de las CDR de región variable de cadena ligera son seleccionadas del grupo que consiste de:

- (i) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22,
- (ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23, y
- (iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24. Preferiblemente, 2 ó 3 de tales CDR de región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo anterior. Los anticuerpos que comprenden secuencias que son sustancialmente homólogas a una o más de las secuencias antes mencionadas también son provistos en esta modalidad.

En una modalidad más, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

- (i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1,
- (ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2, y
- (iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3.

En un aspecto preferido de esta modalidad, una o más de las CDR de región variable de cadena ligera son seleccionadas del grupo que consiste de:

- (i) una CDR1 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88,

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89, y

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90. Preferiblemente, 2 ó 3 de tales CDR de región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo anterior. Los anticuerpos que comprenden secuencias que son sustancialmente homólogas a una o más de las secuencias antes mencionadas también son provistos en esta modalidad.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprenden:

un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 ó 3, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 1, 2 ó 3, y/o un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 4, 5 ó 6, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 4, 5 ó 6.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprenden: un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 7, 8 ó 9, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 7, 8 ó 9, y/o un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 10, 11 ó 12, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 10, 11 ó 12.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprenden: un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 13, 14 ó 15, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 13, 14 ó 15, y/o un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 16, 17 ó 18, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 16, 17 ó 18.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprenden: un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de

SEC ID NOs: 19, 20 ó 21, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 19, 20 ó 21, y/o un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 22, 23 ó 24, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 22, 23 ó 24.

Ciertas modalidades preferidas adicionales de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y que comprenden: un dominio VH que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena pesada de SEC ID NOs: 1, 2 ó 3, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 1, 2 ó 3, y/o un dominio VL que comprende una, dos o tres de las CDR de cadena ligera de SEC ID NOs: 88, 89 ó 90, o secuencias sustancialmente homólogas a una o más de las SEC ID NOs: 88, 89 ó 90.

En modalidades preferidas una, dos o tres de las CDR de cadena ligera son como se definen en SEC ID NOs: 4, 5 y 6; o 88, 89 y 90, y/o una, dos o tres de las CDR de cadena pesada son como se definen en SEC ID NOs: 1, 2 y 3.

Ciertas modalidades preferidas de la invención proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, 71, 73 ó 75, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 70, 72, 74, 76 ó 103, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, 71, 73 ó 75 y un dominio VL que comprende 3 CDR de cadena ligera. Preferiblemente las CDR de cadena ligera tienen SEC ID NOs 4, 5 y 6; o 10, 11 y 12; o 16, 17 y 18; o 22, 23 y 24; o 88, 89 y 90.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 70, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo

que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 71, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 72, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 73, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 74, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 75, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 76, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Las modalidades preferidas adicionales proporcionan un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 103, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma.

Los anticuerpos que comprenden un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y/o un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 103 ó 70, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, son particularmente preferidas.

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 35 (tal anticuerpo también es referido en la presente como C-9P21 scFv), SEC ID NO: 46 (tal anticuerpo también es referido en la presente como B-1M22 scFv), SEC ID NO: 57 (tal anticuerpo también es referido en la presente como C-1I24 scFv), SEC ID NO: 68 (tal anticuerpo también es referido en la presente como D-1K21 scFv), o SEC ID NO: 101 (tal anticuerpo

también es referido en la presente como 9N10 scFv) o que comprende un fragmento de cualquiera de estos que se une a CXCR4 y que tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, o una secuencia sustancialmente homóloga a cualquiera de las secuencias.

Los anticuerpos con base en las secuencias C-9P21 ó 9N10 son particularmente preferidas.

La invención se ejemplifica a través de anticuerpos monoclonales C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10, formas de cadena individual que se muestran en las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 (SEC ID NOs: 35, 46, 57, 68 y 101, respectivamente). Las formas IgG de longitud completa de los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10 se han producido y sus secuencias se muestran en las Tablas 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente. Los dominios CDR, VH y VL de los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10 se muestran en las Tablas 1 a 5 y las Figuras 1 a 5. Los anticuerpos que comprenden estos dominios CDR o los dominios VH y VL (o secuencias sustancialmente homólogas a las mismas) son aspectos preferidos de la invención. Los anticuerpos con base en las secuencias C-9P21 ó 9N10 son particularmente preferidos.

Una modalidad preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo C-9P21 que comprende o consiste de SEC ID NO: 35, que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 34. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende o consiste de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 1 y preferiblemente este anticuerpo se codifica por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1.

Otra modalidad preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo B-1M22 que comprende o consiste de SEC ID NO: 46, que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 45. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende o consiste de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 2 y preferiblemente este anticuerpo se codifica por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 2.

Otra modalidad preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo C-1I24 que comprende o consiste de SEC ID NO: 57, que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 56. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende o consiste de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 3 y preferiblemente este anticuerpo se codifica por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 3.

Otra modalidad preferida de la invención es una forma scFv del

anticuerpo D-1K21 que comprende o consiste de SEC ID NO: 68, que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 67. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende o consiste de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 4 y preferiblemente este anticuerpo se codifica por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 4.

Otra modalidad preferida de la invención es una forma scFv del anticuerpo 9N10 que comprende o consiste de SEC ID NO: 101, que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 100. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende o consiste de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 5 y preferiblemente este anticuerpo se codifica por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 5.

Otras modalidades preferidas son las formas IgG de los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10, preferiblemente formas IgG de longitud completa. La forma IgG1 de cualquiera de estos anticuerpos es más preferida.

De esta forma, otra modalidad preferida de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa que comprende una cadena pesada de SEC ID NO: 108 (amino ácido) y/o una cadena ligera de SEC ID NO: 109 (amino ácido). También preferido es un anticuerpo IgG que comprende una cadena pesada codificada por SEC ID NO: 106 y/o una cadena ligera codificada por SEC ID NO: 107. Por supuesto se entiende que los anticuerpos IgG completos comprenderán dos cadenas pesadas sustancialmente idénticas y dos cadenas ligeras sustancialmente idénticas.

Otra modalidad preferida de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa que comprende una cadena pesada de SEC ID NO: 112 (amino ácido) y/o una cadena ligera de SEC ID NO: 113 (amino ácido). También preferido es un anticuerpo IgG que comprende una cadena pesada codificada por SEC ID NO: 110 y/o una cadena ligera codificada por SEC ID NO: 111.

Otra modalidad preferida de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa que comprende una cadena pesada de SEC ID NO: 116 (amino ácido) y/o una cadena ligera de SEC ID NO: 117 (amino ácido). También preferido es un anticuerpo IgG que comprende una cadena pesada codificada por SEC ID NO: 114 y/o una cadena ligera codificada por SEC ID NO: 115.

Otra modalidad preferida de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa que comprende una cadena pesada de SEC ID NO: 120 (amino ácido) y/o una cadena ligera de SEC ID NO: 121 (amino ácido). También preferido es un anticuerpo IgG que comprende una cadena pesada codificada por SEC ID

NO: 118 y/o una cadena ligera codificada por SEC ID NO: 119.

Otra modalidad preferida de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa que comprende una cadena pesada de SEC ID NO: 108 (amino ácido) y/o una cadena ligera de SEC ID NO: 125 (amino ácido). También preferido es un anticuerpo IgG que comprende una cadena pesada codificada por SEC ID NO: 106 y/o una cadena ligera codificada por SEC ID NO: 123.

Los anticuerpos con base en las secuencias C-9P21 ó 9N10 son particularmente preferidos.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR1 VH tiene o comprende una secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 126 (S/G Y X₃ M/I H/S) o SEC ID NO: 127 (X₁ Y X₃ M H) o SEC ID NO: 128 (S Y X₃ M H).

En estas modalidades X₁ puede ser S o G, preferiblemente S. X₃ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o W o Y o A, más preferiblemente W. Las secuencias CDR1 VH preferidas de esta modalidad son SEC ID NOs: 1, 7, 13 ó 19. Una CDR1 VH particularmente preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR2 VH tiene o comprende una secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 129 (X₁ I X₃ X₄ D G S X₈ X₉ X₁₀ Y A D S V K G). En estas modalidades X₁, X₃, X₄, X₈, X₉ y X₁₀ puede ser cualquier aminoácido. Preferiblemente uno o más, más preferiblemente todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X₁ es V o R (preferiblemente R), X₃ es S o N (preferiblemente N), X₄ es Y o S (preferiblemente S), X₈ es N o S (preferiblemente S), X₉ es K o T (preferiblemente T) y X₁₀ es Y o S (preferiblemente S). De esta forma, una CDR2 VH preferida tiene o comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 130 (V/R I S/N Y/S D G S N/S K/T Y/S Y A D S V K G). Por ejemplo, las secuencias CDR2 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden SEC ID NOs: 2 ó 14. SEC ID NO: 2 es particularmente preferida.

En modalidades adicionales de la presente invención, la CDR2 VH tiene o comprende una secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 131 (X₁ I X₃ P X₅ X₆ G X₈ X₉ N Y A Q K F Q G). En estas modalidades X₁, X₃, X₅, X₆, X₈ y X₉ pueden ser cualquier aminoácido. Preferiblemente uno o más, más preferiblemente todos, de estos residuos X se seleccionan del siguiente grupo: X₁ es R o G (preferiblemente R), X₃ es N o I (preferiblemente N), X₅ es N o I (preferiblemente N), X₆ es S o F (preferiblemente S), X₈ es G o T (preferiblemente G) y X₉ es T o A (preferiblemente T). De esta forma, una CDR2 VH preferida tiene o comprende la

secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 132 (R/G I N/I P N/I S/F G G/T T/A N Y A Q K F Q G). Por ejemplo, las secuencias CDR2 VH preferidas de esta modalidad tienen o comprenden SEC ID NOs: 8 y 20. SEC ID NO: 20 es particularmente preferida.

Debido a la habilidad de los anticuerpos de la invención a no inducir apoptosis significativa de las células que expresan CXCR4 (una habilidad que no ha sido descrita previamente para anticuerpos CXCR4) se cree que los anticuerpos de la invención pueden unirse a un epítipo diferente a los anticuerpos anti-CXCR4 conocidos (por ejemplo, un epítipo que protege a la célula CXCR4+ de apoptosis o un epítipo que no está involucrado en el mecanismo de la apoptosis o que no activa la apoptosis, pero que aún está involucrado en la unión de ligando a CXCR4).

De esta forma, también se proporcionan anticuerpos que pueden competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, C-9 P21, C1I24, D-1K21, B-1M22 ó 9N10) para la unión a CXCR4.

El término "anticuerpos de competencia", como se utiliza en la presente, se refiere a anticuerpos que se unen a aproximadamente sustancial o esencialmente el mismo o aún el mismo como epítipo como un "anticuerpo de referencia". Los "anticuerpos de competencia" incluyen anticuerpos que traslapan las especificidades del epítipo. Los anticuerpos de competencia de esta forma son capaces de efectivamente competir con un anticuerpo de referencia para la unión a CXCR4. Preferiblemente, el anticuerpo de competencia puede unirse al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia. Visto de manera alternativa, el anticuerpo de competencia preferiblemente tiene la misma especificidad de epítipo como el anticuerpo de referencia.

"Anticuerpos de referencia" como se utiliza en la presente son anticuerpos que se pueden unir a un epítipo en un dominio extracelular de CXCR4 humano y que tienen una o más de secuencia CDR como se define en la presente, preferiblemente un dominio VH y un VL como se definen en la presente, preferiblemente un VH de SEC ID NO: 69 y un VL de SEC ID NO: 70, o un VH de SEC ID NO: 71 y un VL de SEC ID NO: 72, o un VH de SEC ID NO: 73 y un VL de SEC ID NO: 74, o un VH de SEC ID NO: 75 y un VL de SEC ID NO: 76, o un VH de SEC ID NO: 69 y un VL de SEC ID NO: 103. Los anticuerpos de referencia más preferidos se seleccionan de C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10.

La identificación de uno o más anticuerpos de competencia es ahora un tema técnico directo en donde han sido provistos los anticuerpos de referencia

tales como C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10. Como la identificación de los anticuerpos de competencia se determina en comparación con un anticuerpo de referencia, se entenderá que la determinación actual del epítipo al cual cualquiera o ambos anticuerpos se unen no se requiere de ninguna forma con el fin de identificar un anticuerpo de competencia. Sin embargo, se puede llevar a cabo el mapeo del epítipo utilizando técnicas estándar si se desea.

A manera de ejemplo, los siguientes métodos para la identificación y definición de los epítipos se mencionan en la presente. La secuencia de aminoácido de CXCR4 es conocida, de tal forma que los péptidos sintéticos pueden utilizarse para el mapeo del epítipo, por ejemplo, utilizando el ensayo Pepscan. La mutagénesis dirigida al sitio también es una herramienta poderosa en el mapeo de los epítipos y puede utilizarse para evaluar el papel de los aminoácidos individuales en la formación del complejo inmunitario. La formación de huellas proteicas se basa en el hecho de que el epítipo está protegido de separación cuando se une a un complejo de anticuerpo-antígeno. El ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) y la hemaglutinación y la tinción de ranuras también pueden utilizarse en el mapeo del epítipo. La cristalización del antígeno con el anticuerpo puede utilizarse para hacer un mapa de un epítipo no lineal. Los protocolos para llevar a cabo tales métodos están ampliamente disponibles y el experto en la técnica estará consciente de métodos alternativos adecuados para el mapeo de epítipos.

La identificación de anticuerpos de competencia puede fácilmente determinarse utilizando cualquiera de una variedad de ensayos de clasificación inmunológica en donde la competencia del anticuerpo puede evaluarse. Todos tales ensayos son rutinarios en la técnica y además se describen con detalle. Cada una de Patentes de E. U. A. Nos. 6,342,219, 6,524,583, 7,056,509, 6,887,468, 6,342,221, 6,676,941, 6,703,020 y 6,416,758 que se incorporan específicamente en la presente por referencia para los propósitos de incluir aun adicionalmente las enseñanzas de la presente que se refieren a cómo identificar anticuerpos de competencia.

Por ejemplo, cuando los anticuerpos de prueba se van examinar se obtienen de diferentes fuentes animales, o aún de diferentes isotipos, se puede utilizar un ensayo de competencia simple en donde los anticuerpos de referencia y de prueba se mezclan (o pre-adsorben), y se aplican en una composición que contiene CXCR4, preferiblemente células que expresan CXCR4, fago que despliega CXCR4, o biochips que contienen CXCR4 inmovilizados. Los protocolos

con base en ELISA son particularmente adecuados para utilizarse en tales estudios de competencia simple.

En ciertas modalidades, se podrían pre-mezclar los anticuerpos de referencia (por ejemplo, C-9 P21, C1I24, D1K21, B-1M22 ó 9N10) con cantidades variables de anticuerpos de prueba (por ejemplo, 1:10, 1:100 ó 1:1000) durante un periodo de tiempo antes de aplicar a una composición de antígeno. En otras modalidades, las cantidades de referencia y las variables de los anticuerpos de prueba pueden simplemente mezclarse durante la exposición a la composición del antígeno. En cualquier caso, al utilizar anticuerpos de especies o isotipos secundarios será capaz de detectar solamente los anticuerpos de referencia unidos. La unión de los cuales se reducirá por la presencia de un anticuerpo de prueba que “compite” para la unión.

En la conducción de un estudio de competencia de anticuerpo entre un anticuerpo de referencia y un anticuerpo de prueba (independientemente de la especie o isotipo), primero se puede marcar la referencia (por ejemplo, C-9 P21, C1I24, D1K21, B-1M22 ó 9N10) con una etiqueta detectable, tal como, por ejemplo, una etiqueta de biotina o una etiqueta enzimática o radioactiva para permitir la posterior identificación. En estos casos, se podrían pre-mezclar o incubar los anticuerpos de referencia marcados con los anticuerpos de prueba a ser examinados en varias proporciones (por ejemplo, 1:10, 1:100 ó 1:1000) y (opcionalmente después de un periodo de tiempo adecuado) después de ensayar la reactividad de los anticuerpos de referencia marcados y comparar estos con un valor de control en donde no se ha incluido un anticuerpo de prueba de competencia potencialmente en la incubación.

El ensayo puede ser cualquiera de un intervalo de ensayos inmunológicos con base en la unión del anticuerpo, y los anticuerpos de referencia podrían detectarse por medio de la detección entre su etiqueta, por ejemplo, utilizando estreptavidina en el caso de anticuerpos biotinilados o mediante el uso de un sustrato cromogénico en conexión con una etiqueta enzimática (tal como el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con peroxidasa enzima) o a través de la detección simple de una etiqueta radioactiva. Un anticuerpo que compite con los anticuerpos de referencia para la unión a CXCR4 será capaz de efectiva o significativamente reducir la unión del anticuerpo de referencia a CXCR4, según demostrado por una reducción en la etiqueta unida.

La reactividad de los anticuerpos de referencia (marcados) en la ausencia de un anticuerpo completamente relevante podría ser el alto valor de

control. El bajo valor de control podría obtenerse a través de la incubación de los anticuerpos de referencia marcados (por ejemplo, C-9 P21, C1I24, D1K21, B-1M22 ó 9N10) con anticuerpos no marcados de exactamente el mismo tipo, cuando la competencia ocurriría y reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en la presencia de un anticuerpo de prueba indica un anticuerpo de prueba que "compite", con el anticuerpo marcado para unión a CXCR4.

Una reducción significativa es una reducción "reproducible", es decir consistentemente observada en la unión. Una "reducción significativa" en términos de la presente solicitud se define como una reducción reproducible (en la unión del anticuerpo de referencia a CXCR4 en un ELISA u otro ensayo adecuado) de por lo menos 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ó 65%, aún más preferiblemente de aproximadamente 70%, de aproximadamente 75% o de aproximadamente 80% en cualquier proporción entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100. Los anticuerpos con actividades de competencia aún más estrictas exhibirán una reducción reproducible (en la unión del anticuerpo de referencia a CXCR4 en ELISA u otro ensayo adecuado) de al menos aproximadamente 82%, aproximadamente 85%, aproximadamente 88%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92% o aproximadamente 95%, etc., en cualquier proporción entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100. La competencia completa o casi completa, tal como la exhibición de una reducción reversible en la unión del anticuerpo de referencia a CXCR4 de aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 97% o aproximadamente 96%, etc., aunque no existen medios requeridos para la práctica de esta invención, ciertamente no se excluyen.

El método descrito anteriormente es solamente un ejemplo de un ensayo de competencia adecuado. El experto en la técnica está consciente de otros métodos y variaciones adecuados. Un ensayo de competencia alternativo se describe a continuación.

Antes de llevar a cabo el ensayo de competencia alternativo utilizando citometría de flujo, algunas cantidades del anticuerpo de prueba deberán marcarse, por ejemplo, por biotinilación. Se determina la funcionalidad (retención de las propiedades de unión de la célula) del producto biotinilado, y la concentración mínima del anticuerpo biotinilado de la invención (Ab1) que dan una unión sub-máxima contra el número fijo de células CXCR4+. Un total de 10^6

células se cosechan de cultivos exponencialmente en crecimiento y se incuban con varias concentraciones del anticuerpo durante un periodo de tiempo adecuado a una temperatura adecuada, por ejemplo, 1 hr a 4°C. Las células se lavan e incuban con anticuerpo de detección adecuado durante un periodo de tiempo adecuado a una temperatura adecuada, por ejemplo, una hora adicional a 4°C. Después del lavado, las células se analizan a través de citometría de flujo. Para cada anticuerpo de prueba, se genera una curva de saturación de los datos graficando la intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) contra la concentración del anticuerpo.

Para el ensayo de competencia alternativo, las células CXCR4+ pueden prepararse como anteriormente y tratarse por duplicado con una mezcla de una concentración fija del anticuerpo marcado (biotinilado) (bio-Ab1) y aumentando las concentraciones del anticuerpo de competencia no marcado. La concentración fija es la concentración mínima del anticuerpo que genera una señal de fluorescencia razonable contra un número fijo de células tumorales como se determina anteriormente. Idealmente, esta concentración fija en nM deberá estar por debajo de la afinidad del anticuerpo probado en equilibrio (K_D). En este caso el método descrito puede utilizarse para la estimación de afinidades de los anticuerpos de competencia (Schodin and Kranz, 1993, Binding affinity and inhibitory properties of a single-chain anti-T cell receptor antibody. *J Biol Chem* **268**: 25722-7). La mezcla del anticuerpo se incuba con células objetivo durante un periodo de tiempo adecuado a una temperatura adecuada, por ejemplo, 1 hr a 4°C. Las células se lavan y la unión de las células del anticuerpo biotinilado se revela a través de la incubación con estreptavidina marcada con FITC. Después de sustraer la fluorescencia de fondo (PBS-5% FCS) de la lectura de fluorescencia media para cada muestra de prueba (bio-Ab1 + Ab2), el porcentaje de inhibición se calcula para cada concentración Ab2 "c" de acuerdo con la fórmula:

se calcula

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - \text{MFI}^{\text{bio-Ab1} + \text{Ab2}^{\text{c}}} / \text{MFI}^{\text{bio-Ab1}}) \times 100$$

Se contempla cualquiera de los anticuerpos que puede unirse a CXCR4 y que puede competir con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, pero los anticuerpos preferidos se establecen a continuación. Por consiguiente, en algunas modalidades preferidas se proporciona lo siguiente.

Un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, en donde el anticuerpo

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4;

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5; y/o

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6; y/o

en donde la región variable de cadena pesada comprende

(iv) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1;

(v) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2; y/o

(vi) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

Un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, en donde el anticuerpo

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10;

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11; y/o

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 12; y/o

en donde la región variable de cadena pesada comprende

(iv) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7;

(v) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID

NO: 8; y/o

(vi) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID

NO: 9; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

Un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, en donde el anticuerpo

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16;

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17; y/o

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18; y/o

en donde la región variable de cadena pesada comprende

(iv) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13;

(v) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14; y/o

(vi) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

Un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, en donde el anticuerpo

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22;

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23; y/o

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24; y/o

en donde la región variable de cadena pesada comprende

(iv) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19;

(v) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20; y/o

(vi) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

Un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CXCR4 humano y que preferiblemente tiene la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4, en donde el anticuerpo

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(i) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88;

(ii) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89; y/o

(iii) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90; y/o

en donde la región variable de cadena pesada comprende

(iv) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1;

(v) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2; y/o

(vi) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

En una modalidad, el anticuerpo

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 69 y un dominio VL de SEC ID NO: 70; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

En una modalidad, el anticuerpo

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 71 y un dominio VL de SEC ID NO: 72; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

En una modalidad, el anticuerpo

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 73 y un dominio VL de SEC ID NO: 74; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

En una modalidad, el anticuerpo

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 75 y un dominio VL de SEC ID NO: 76; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

En una modalidad, el anticuerpo

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 69 y un dominio VL de SEC ID NO: 103; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

Preferiblemente, el anticuerpo (b) tiene una o más secuencias CDR, dominios VH y/o dominios VL descritos en la presente.

Preferiblemente, el anticuerpo (b) puede unirse al mismo epítipo como el anticuerpo (a).

Ciertos ejemplos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que tienen por lo menos 70% de identidad con las secuencias de aminoácidos descritas. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención que se unen a CXCR4 y que tienen la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 comprenden por lo menos una región variable de cadena ligera que incluye una región de secuencia de aminoácido de al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%,

más preferiblemente al menos aproximadamente 90% ó 95% y más preferiblemente al menos aproximadamente 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 70, 72, 74, 76 ó 103; y/o al menos una región variable de cadena pesada que incluye una región de secuencia de aminoácido de al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% ó 95% y más preferiblemente al menos aproximadamente 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácido a la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, 71, 73 ó 75.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia de aminoácido descrita.

Otros ejemplos preferidos de secuencias sustancialmente homólogas son secuencias que contienen hasta 1, 2, 3 ó 4 preferiblemente hasta 1 ó 2, aminoácidos alterados en una o más de las regiones CDR descritas. Tales alteraciones podrían ser sustituciones de aminoácido conservadoras o no conservadoras, o una de sus mezclas.

En tales modalidades, las alteraciones preferidas son sustituciones de aminoácido conservadoras.

En todas las modalidades, los anticuerpos que contienen secuencias sustancialmente homólogas retienen la habilidad de unirse a CXCR4 y preferiblemente retienen una o más de las otras propiedades descritas en la presente, por ejemplo, la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y/o la propiedad de ser antagonicas.

Otras modalidades de la presente invención proporcionan proteínas de unión que se unen a CXCR4 y preferiblemente tienen una o más de las otras propiedades descritas en la presente, por ejemplo, tienen la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 y/o la propiedad de ser antagonicas y que comprenden un anticuerpo de la invención, un dominio VH o VL de la invención, o una o más de las CDR de la invención. En una modalidad preferida, tales proteínas de unión son anticuerpos.

Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR. Las secuencias ilustrativas y preferidas para estas CDR se describen en la presente.

Como se utiliza en la presente, el término abreviado "CXCR4", a menos que se afirme específicamente lo contrario o se haga claro a partir de la terminología científica, significa el receptor de quimiocina CXC 4 (también conocido como fusina, HM89, LESTR o HUMSTR).

CXCR4 puede ser CXCR4 libre, por ejemplo, CXCR4 recombinante o purificado, pero preferiblemente está presente en una forma nativa, por ejemplo, en la superficie de una célula.

Los anticuerpos o proteínas de unión de la invención también pueden unirse a fragmentos de CXCR4, en particular fragmentos que comprenden o consisten de todo o parte del dominio extracelular de CXCR4, o pueden unirse a entidades que comprenden CXCR4 o fragmentos de CXCR4. Ciertamente, los epítomos de los anticuerpos de la invención se localizan en el dominio extracelular de CXCR4.

"CXCR4" también puede referirse a cualquier forma de CXCR4, particularmente como CXCR4 se conserva a través de especies de mamífero. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención de esta forma pueden unirse a CXCR4 de humano, mono (por ejemplo, mono cynomolgus o mono Macaca mulatta/rhesus), ratón (murino), vaca (bovino), rata, hámster, hurón, conejillo de indias y/o conejo, por ejemplo. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unirán a por lo menos CXCR4 humano. De esta forma, a menos que se afirme lo contrario, cualquier referencia en la presente a "CXCR4" puede leerse para significar "CXCR4 humano". En ciertas modalidades preferidas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unirán a por lo menos un CXCR4 humano y mono (por ejemplo, mono cynomolgus o mono Macaca mulatta/rhesus). En otras modalidades preferidas los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unirán a por lo menos un CXCR4 de humano y ratón. En otras modalidades preferidas los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención se unirán a por lo menos un CXCR4 humano, de mono y ratón.

Como se utiliza en la presente, el término "que se une a CXCR4" o "anti-CXCR4" en el contexto de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención, significa anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que son capaces de uno o más de los siguientes; preferiblemente, de uno o más de los siguientes; y más preferiblemente, de todos los siguientes:

(a) unirse a CXCR4 expresado en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula transfectada con CXCR4 o una célula que naturalmente

expresa CXCR4, por ejemplo, como se evalúa por citometría de flujo o inmunohistoquímica;

(b) unirse a un epítipo CXCR4 conformacionalmente dependiente (por ejemplo, no lineal), por ejemplo como se evalúa por la unión a CXCR4 en Western bajo condiciones no de reducción;

(c) unirse a por lo menos un CXCR4 humano, más preferiblemente a un CXCR4 de humano y mono o a un CXCR4 de humano y ratón, más preferiblemente a CXCR4 de humano, mono y ratón;

(d) unirse a un CXCR4 de humano y mono o a un CXCR4 de humano y ratón con la afinidad de similares, por ejemplo, con un Kd de 10 nM o menor, preferiblemente 5 nM o menor, más preferiblemente 3 nM o menor o 2n M o menor, por ejemplo 1 nM o menor como también se explica en cualquier lugar en la presente.

Los anticuerpos preferidos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención también son capaces de uno o más de los siguientes; preferiblemente, de más de uno de los siguientes; y más preferiblemente, de todas las propiedades funcionales siguientes:

(e) no inducir apoptosis significativa de células que expresan CXCR4;

(f) bloquear o inhibir la unión de CXCR4 a uno o más de sus ligandos, por ejemplo, bloquear o inhibir la unión de CXCR4 a por lo menos SDF-1 o un ligando alternativo para CXCR4, por ejemplo, el compuesto químico AMD-3100, y preferiblemente inhibir la unión de CXCR4 a por lo menos ambos de SDF-1 y AMD-3100;

(g) bloquear o inhibir los eventos de señalización en corriente abajo del receptor CXCR4, por ejemplo, inhibir las respuestas celulares mediadas por CXCR4to a un ligando CXCR4 tal como SDF-1, por ejemplo preferiblemente para inhibir la liberación de los iones de calcio en respuesta al ligando CXCR4 tal como SDF-1 o bloquear o inhibir la migración inducida por el ligando (por ejemplo, SDF-1) de células CXCR4+;

(h) inducir ADCC de células CXCR4+ como se describe en cualquier lugar en la presente;

(i) inducir efectos antitumorales *in vivo*;

(j) localizar los tumores después de la administración a un animal con un tumor;

(k) inducir CDC de células CXCR4+;

(l) inducir efectos anti-víricos, en particular efectos anti-VIH, *in vitro* o *in vivo*;

(m) no exhibir una actividad antagónica con respecto al receptor CXCR4;

En el contexto de la unión de las células CXCR4⁺, se debe entender que los anticuerpos de la presente invención que se unen a células CXCR4⁺ y que no se unen significativamente a células CXCR4⁻ (como se muestra en el Ejemplo 2).

El término “no se unen significativamente a células CXCR4⁻” deberá entenderse de tal forma que cualquier unión del anticuerpo a células CXCR4⁻ no prohíbe el uso de tal anticuerpo para propósitos terapéuticos o diagnósticos. De esta forma, la unión “insignificante” a células CXCR4⁻ incluye la situación en donde la unión del anticuerpo a las células CXCR4⁻ es significativamente más débil que su unión a una o más células CXCR4⁺ o puede considerarse como un nivel de fondo, por ejemplo, comparativo con o no significativamente diferente de un nivel observado en un experimento de control negativo.

Para propósitos terapéuticos o de diagnóstico la consideración principal es que el anticuerpo debe unirse más fuertemente a uno o más tipos de células CXCR4⁺ que cualquiera de las células CXCR4⁻ con las cuales el anticuerpo puede ponerse en contacto durante la aplicación terapéutica o de diagnóstico.

Los anticuerpos de la invención pueden ser referidos como “específicos de CXCR4”. El término “específico de CXCR4” deberá interpretarse de tal forma que la unión del anticuerpo a células que expresan CXCR4 es suficientemente específica para permitir el uso de tal anticuerpo para propósitos terapéuticos o de diagnóstico. El anticuerpo específico CXCR4 como se describe en la presente tiene la habilidad de unir CXCR4 (por ejemplo, en la superficie de una célula) pero no se une significativamente a proteínas no-CXCR4 (por ejemplo, no se une específicamente a células CXCR4⁻). El experto en la técnica puede fácilmente determinar si cualquier anticuerpo dado es específico de CXCR4 mediante la comparación de la potencia de la unión a la célula CXCR4⁺ objetivo (por ejemplo, una célula transfectada con y que expresa CXCR4, o una célula que naturalmente expresa CXCR4, por ejemplo, células Ramos, células Jurkat, células CCRF-CEM, células Raji), con la potencia de unión a uno o más tipos de células CXCR4⁻, por ejemplo, células de tipo silvestre no transformadas con CXCR4 tales como células HEK293T o células DT40.

Se describe en la técnica que CXCR4 tiene una tendencia a desarrollar de alguna formas diferentes conformaciones que dependen del tipo de la célula que la expresa (ver, por ejemplo, Baribaud y otros, 2001). De esta forma, los anticuerpos de la invención son referidos como teniendo la habilidad de unirse a CXCR4 en la superficie de una célula cuando se pueden unir a uno o más tipos de célula que han sido transfectados con CXCR4 o que naturalmente expresan CXCR4. Los anticuerpos preferidos tienen la habilidad de unirse a CXCR4 en múltiples tipos de células y de esta forma tienen la habilidad de unirse a múltiples conformación de CXCR4. Por ejemplo, los anticuerpos C-9P21, 9N10 y C-1I24 descritos en la presente muestran tales habilidades.

El experto en la técnica estará consciente de que la unión a células CXCR4⁺ comparado con células CXCR4⁻ puede evaluarse, por ejemplo, utilizando citometría de flujo y un ensayo adecuado como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Las técnicas de inmunohistoquímica, que son bien conocidos en la técnica pueden utilizarse para clasificar la unión de los anticuerpos en células o muestras. Tales ensayos pueden utilizarse para ensayar la especificidad del anticuerpo particular, o para detectar la expresión de CXCR4 en muestras de tejido. Brevemente, el anticuerpo puede ensayarse por ejemplo en un arreglo de alta intensidad de tejidos humanos incluyendo un control positivo (células que se sabe que son CXCR4 positivas) y control negativo (células que se sabe que son CXCR4 negativas). La intensidad de tinción membranosa puede estimarse a través de inspección visual en una escala de cuatro pasos (0,1,2,3). Los anticuerpos preferidos muestran clasificaciones de débil a fuerte (es decir, clasificaciones por arriba de 0), preferiblemente clasificaciones inmunohistoquímicas fuertes para tejidos CXCR4⁺.

Como se explicó anteriormente, los anticuerpos de la invención tienen la propiedad de no inducir apoptosis significativa de células CXCR4⁺ (células que expresan CXCR4). Por el término “no inducen apoptosis significativa de células CXCR4⁺” significa que los niveles de apoptosis inducidos en la presente de un anticuerpo son comparables con o no son significativamente diferentes de los niveles de apoptosis inducidos en la ausencia de un anticuerpo, por ejemplo, bajo condiciones de control negativo o un nivel de fondo, por ejemplo, en la presencia de un medio de cultivo solo. De esta forma, preferiblemente los anticuerpos de la invención no incluyen un aumento miscible o significativo en la apoptosis sobre niveles naturales, o de fondo o de control de apoptosis. Esto está en contraste con los anticuerpos de la técnica anterior tales como los anticuerpos

Medarex descritos en WO 2008/060367 (por ejemplo, F7) que inducen apoptosis miscible y significativa comparada con la apoptosis observada en la ausencia del anticuerpo (también ver el Ejemplo 10 de la presente). Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inducen una apoptosis significativa de las concentraciones del anticuerpo de $\geq 0.4 \mu\text{g/ml}$, por ejemplo, a concentraciones de al menos $0.4 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $6 \mu\text{g/ml}$, $7 \mu\text{g/ml}$, $8 \mu\text{g/ml}$, $9 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $11 \mu\text{g/ml}$, $12 \mu\text{g/ml}$, $15 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$, $25 \mu\text{g/ml}$, $30 \mu\text{g/ml}$, $40 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $75 \mu\text{g/ml}$ and $100 \mu\text{g/ml}$ (preferiblemente en IgG, por ejemplo, formas de IgG1). Más preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inducen una apoptosis significativa cuando se evalúan en la línea de células Ramos CXCR4+ *in vitro* (por ejemplo, cuando se evalúan utilizando un ensayo como se describe en el Ejemplo 10). Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inducen una apoptosis significativa cuando se utilizan a concentraciones de $\geq 0.14 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, por ejemplo, a concentraciones de o al menos $0.14 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $0.25 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $0.5 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $1 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $2 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $3 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $3.5 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $4 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $5 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $10 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $15 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $20 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $25 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, $30 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células y $35 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ células, más preferiblemente las células son células RAMOS. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no inducen apoptosis significativa cuando se utilizan a una concentración terapéuticamente útil (por ejemplo, a una concentración de anticuerpo de $\geq 0.4 \mu\text{g/ml}$, por ejemplo, a concentraciones de o al menos $0.4 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$, $3 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$, $6 \mu\text{g/ml}$, $7 \mu\text{g/ml}$, $8 \mu\text{g/ml}$, $9 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $11 \mu\text{g/ml}$, $12 \mu\text{g/ml}$, $15 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$, $25 \mu\text{g/ml}$, $30 \mu\text{g/ml}$, $40 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$, $75 \mu\text{g/ml}$ y $100 \mu\text{g/ml}$ (preferiblemente en IgG, por ejemplo, en la forma de IgG1, preferiblemente la concentración del anticuerpo es la concentración del anticuerpo en suero). A manera de ejemplo, un anticuerpo que no induce apoptosis significativa de células CXCR4+ es un anticuerpo que no causa que más del 10% de las células se hagan apoptóticas después de la incubación con el anticuerpo de un ensayo que define las células apoptóticas como aquellas que son positivas a la unión de Anexina V. Un ensayo preferido se describe en el Ejemplo 10 e involucra el uso de células Ramos y anticuerpos IgG1 hasta una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$. Visto alternativamente, un anticuerpo que no induce apoptosis significativa de células CXCR4+ es un anticuerpo en donde cualquier aumento en la apoptosis por arriba del nivel de fondo o de control es un aumento de un máximo de 50% sobre tal nivel de fondo o control en un ensayo que define

las células apoptóticas como aquellas que son positivas a la unión de Anexina V. Un ensayo preferido se describe en el Ejemplo 10 e involucra el uso de células Ramos y anticuerpos IgG1 de hasta una concentración de 10 µg/ml.

La inducción de la apoptosis puede ensayarse utilizando métodos estándares bien conocidos, por ejemplo métodos que ensayan la tinción con Anexina V (por ejemplo, un método ilustrativo que involucra la tinción con Anexina ver Ejemplo 10). En breve, las células (por ejemplo, células Ramos) pueden incubarse con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo en el formato IgG1) durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, 24 ó 48 horas y el efecto, después de cosechar la célula y la tinción con Anexina V puede medirse a través de análisis FACS (por ejemplo, utilizando EasyCyte). La tinción con Anexina V es indicativa de células apoptóticas, mientras las células muertas pueden identificarse (y distinguirse de las células apoptóticas) a través de por ejemplo tinción PI.

Los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10 han demostrado que son capaces de inhibir la señalización inducida por el ligando a través de CXCR4, por ejemplo, la inhibición de las respuestas celulares ligadas por CXCR4 a un ligando CXCR4 tal como SDF-1, en particular a través de la inhibición de la liberación de los iones de calcio en respuesta a un ligando CXCR4 tal como SDF-1 (ver Ejemplo 6). De esta forma, los anticuerpos de la invención son preferiblemente capaces de inhibir las respuestas celulares ligadas por CXCR4 a un ligando CXCR4 tal como SDF-1, en particular a través de la inhibición de la liberación de los iones de calcio en respuesta a un ligando CXCR4 tal como SDF-1. En particular, los anticuerpos son preferiblemente capaces de inhibir el flujo de calcio inducido por SDF-1. Tales métodos de ensayo son conocidos y un ensayo se describe en el Ejemplo 6.

El "bloqueo" o "inhibición" de varios eventos mediados por CXCR4 se describen en la presente tales como los eventos de señalización en corriente abajo de CXCR4, la señalización inducida por el ligando a través de CXCR4, las respuestas celulares mediadas por CXCR4 a un ligando CXCR4, la liberación de iones de calcio, la migración inducida por el ligando, etc., significa que la propiedad en cuestión es miscible o significativamente se reduce en la presencia del anticuerpo de la invención comparado con la ausencia del anticuerpo. Por ejemplo, tal propiedad puede reducirse en al menos 10, 20, 30, o 40%, más preferiblemente al menos 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75%, aún más preferiblemente al menos 80% en la presencia del anticuerpo comparado con la unión en la ausencia del anticuerpo. La reducción en al menos 85, 90 ó 95% también se contemplan

para ciertas propiedades.

En el caso de bloque o inhibición de la liberación de iones de calcio (flujo de calcio) en al menos 20% o 30% de inhibición por lo general se ve con anticuerpos de la invención que elevan hasta al menos 70%, 75%, 80% o 95% (ver Ejemplo 6). Las concentraciones ilustrativas del anticuerpo utilizado para obtener tal inhibición son de 4 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$. En ciertas modalidades de la invención, la concentración del anticuerpo capaz de elevarse a 50% de inhibición de la liberación de iones de calcio (IC_{50}) de células CXCR4+, por ejemplo, células CCRF-CEM, *in vitro*, es preferiblemente menor de 50 nM, 40 nM, 35 nM o 30 nM (o cualquier número entero entre 30 y 50), 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM o 5 nM (o cualquier número entero entre 5 y 30). Por ejemplo, el anticuerpo C-9P21 de la invención ha demostrado que tiene un IC_{50} de 29 nM para células CCRF-CEM. El anticuerpo 9N10 ha demostrado que tiene IC_{50} de 3.85 nM para células CCRF-CEM.

En algunas modalidades, los anticuerpos pueden bloquear o inhibir la migración o la quimiotaxis de células CXCR4+ hacia un ligando de CXCR4 tal como SDF-1 (ver Ejemplo 7). La inhibición de la migración en la quimiotaxis puede ensayarse utilizando métodos estándar, por ejemplo, utilizando un ensayo de trans-cavidad. En resumen, las células capaces de quimiotaxis que expresan CXCR4 se ponen en contacto con el anticuerpo en una cámara y un ligando de CXCR4 tal como SDF-1 se coloca en otra cámara separada de la primera cámara por una membrana de filtro que tiene un tamaño de poro adecuado. El efecto del anticuerpo sobre la migración celular hacia el ligando (quimiotaxis) se determina comparando la quimiotaxis en la presencia del anticuerpo a la quimiotaxis en la ausencia del anticuerpo. Un ensayo adecuado se describe en el Ejemplo 7. Por lo menos el 50% y hasta el 100% de inhibición de la migración se ve dependiendo de la concentración del anticuerpo.

En ciertas modalidades de la invención, la concentración del anticuerpo capaz de dar origen al 50% de inhibición de migración celular (IC_{50}) de células CXCR4+, por ejemplo, células CCRF-CEM, *in vitro*, es preferiblemente menor de 20 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ (o cualquier número entero entre 15 y 20), 10 $\mu\text{g/ml}$ (o cualquier número entero entre 10 y 15), 5 $\mu\text{g/ml}$ (o cualquier número entero entre 5 y 10), 4 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ o 1 $\mu\text{g/ml}$. Por ejemplo, el anticuerpo C-9P21 de la invención ha demostrado que tiene un IC_{50} de 2.9 $\mu\text{g/ml}$ para células CCRF-CEM. En ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos son capaces del 100% de inhibición *in vitro* a 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ o

30 µg/ml (o cualquier número entero entre 6 y 30 µg/ml).

Preferiblemente los anticuerpos de la invención (por ejemplo, C-9P21, C-1I24, D-1K21, B-1M22 y 9N10) son capaces de inhibir la unión de CXCR4 a uno o más de sus ligandos. Preferiblemente, la unión de por lo menos SDF-1 se inhibe. Más preferiblemente, la unión a SDF-1 y AMD-3100 se inhibe. Por ejemplo, los anticuerpos C-9P21, C-1I24, 9N10 y D-1K21 han demostrado que son capaces de inhibir la unión de CXCR4 a su ligando SDF-1 (Ejemplo 3). Los anticuerpos C-9P21, C-1I24 y D-1K21 han demostrado que son capaces de inhibir la unión de CXCR4 a AMD-3100 (Ejemplo 3). Dados sus efectos en el flujo de calcio, se puede esperar que B-1M22 también compita con el ligando para la unión a CXCR4.

Por "bloqueo de la unión" o inhibición de la unión" de un ligando a CXCR4 significa que la unión del ligando a CXCR4 es miscible o significativamente reducida, por ejemplo se reduce en al menos 10, 20, 30, o 40%, más preferiblemente al menos 45, 50, 55, 60, 65, 70 ó 75%, aún más preferiblemente al menos 80% en la presencia del anticuerpo comparado con la unión en la ausencia del anticuerpo. En modalidades en donde la unión del ligando a CXCR4 se reduce en al menos 85, 90 ó 95% también se contemplan. Visto alternativamente, cuando el ligando primero se pone en contacto con CXCR4 y el anticuerpo posteriormente se adiciona, el ligando puede inhibir la unión del anticuerpo a CXCR4.

Los ensayos para determinar si un anticuerpo puede inhibir la unión de un ligando a CXCR4 son bien conocidos y serán inmediatamente evidentes para un experto en la técnica. Un ensayo adecuado se describe en el Ejemplo 3. Brevemente, las células CXCR4+ se incubaron con SDF-1 (o AMD-3100, según sea apropiado) o sin SDF-1 (o AMD-3100, según sea apropiado), después el anticuerpo se agregó y el anticuerpo después se detectó con un anticuerpo anti-humano marcado. Para anticuerpos con la habilidad de inhibir la unión de un ligando a CXCR4, la pre-incubación en la presencia de SDF-1 (o AMD-3100, según sea apropiado) dio como resultado la reducción de la unión del anticuerpo a CXCR4. Particularmente, la unión del anticuerpos a células Ramos, células Jurkat o células CCRF-CEM que naturalmente expresa CXCR4 y se pre-incubaron con SDF-1 o AMD-3100 se inhibieron. Alternativamente, los anticuerpos que se han ensayado pueden agregarse a las células al mismo tiempo que el ligando, o los anticuerpos pueden agregarse primero.

Los ensayos alternativos para determinar si un anticuerpo puede

bloquear la unión del ligando a CXCR4 incluyen el uso de un ligando marcado, por ejemplo, ligando radiomarcado.

A pesar de que no es mecanismo principal de acción de los anticuerpos de la invención, los anticuerpos de la invención preferiblemente tienen la habilidad de inducir la citotoxicidad celular dependiendo del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) de células CXCR4+. ADCC puede ensayarse *in vitro* utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un método adecuado en el cual las células CXCR4+, por ejemplo, células CCRF-CEM, se marcan con una etiqueta fluorescente con el fin de evaluar la lisis de ADCC en la presencia de PBMC se describe en el Ejemplo 8. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo de liberación de Cromio-51, por ejemplo. De esta forma, los anticuerpos de la invención pueden por ejemplo causar por lo menos 10%, 15%, 20%, 22%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de aniquilación de células CXCR4+ *in vitro*, por ejemplo, en la presencia de PBMC humano. Los anticuerpos que pueden inducir 100% o casi 100% de aniquilación también se incluyen. Por ejemplo, el anticuerpo B-1M22 ha demostrado que induce 100% (o casi 100% dados los límites de error experimental) de aniquilación en algunos experimentos (ver Ejemplo 8, en donde esencialmente se induce el 100% de aniquilación de la línea celular CXCR4+ CCRF-CEM en la presencia de PBMC humano y el anticuerpo B-1M22). Además, al nivel IgG, los anticuerpos C-9P21 y C-1I24 han demostrado que causan por lo menos 50%, 55% o 60% de aniquilación de la línea celular CXCR4+ CCRF-CEM en la presencia de PBMC humano, el anticuerpo D-1K21 ha demostrado que causa por lo menos 15%, 20% o 25% de aniquilación de la línea celular CXCR4+ CCRF-CEM en la presencia de PBMC (ver Ejemplo 8).

Aunque no es el mecanismo principal de acción de los anticuerpos de la invención, ADCC es ventajosa para algunas aplicaciones, particularmente algunas aplicaciones terapéuticas. De esta forma, en modalidades preferidas el anticuerpo puede inducir ADCC de células CXCR4+, preferiblemente células tumorales CXCR4+ en la presencia de PBMC. En otras modalidades, los anticuerpos inducen poca o ADCC no significativa.

Los anticuerpos de la invención preferiblemente también demuestran que son adecuadamente potentes en términos de concentración del anticuerpo requerido para obtener tales niveles de ADCC. De nuevo, una prueba adecuada *in vitro* se describe en el Ejemplo 8.

De esta forma, la concentración del anticuerpo requerida para la lisis celular máxima media (EC_{50}) de células CXCR4+, por ejemplo, células CCRF-

CEM, *in vitro* es preferiblemente menor de 2000 ng/ml, 1500 ng/ml, 1000 ng/ml, 700 ng/ml, 650 ng/ml, 620 ng/ml, 600 ng/ml, 550 ng/ml, 500 ng/ml, 450 ng/ml, 400 ng/ml, 350 ng/ml, 300 ng/ml, 250 ng/ml, 200 ng/ml, 150 ng/ml, 125 ng/ml, 100 ng/ml, 90 ng/ml, 80 ng/ml, 70 ng/ml, 60 ng/ml, 50 ng/ml, 45 ng/ml, 40 ng/ml, 35 ng/ml, 30 ng/ml, 25 ng/ml, 20 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml, 9 ng/ml, 7 ng/ml, 5 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0.5 ng/ml o 0.25 ng/ml. Por ejemplo, al nivel de IgG, el anticuerpo C-9P21 de la invención ha demostrado tener un EC_{50} de 1852 ng/ml para células CCRF-CEM, y el anticuerpo C1I24 de la invención ha demostrado tener un EC_{50} de 49.2 ng/ml para células CCRF-CEM. El anticuerpo D-1K21 de la invención ha demostrado tener un EC_{50} de 79.9 ng/ml y el anticuerpo B-1M22 de la invención ha demostrado tener un EC_{50} de 115.7 ng/ml.

En algunas modalidades, los anticuerpos pueden inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de células CXCR4+, pero en otras modalidades los anticuerpos no son capaces de inducir CDC. Por ejemplo, los anticuerpos B-1M22 y C1I24, en particular C-1I24, han demostrado tener una buena habilidad para inducir CDC de células CXCR4+, por ejemplo, en células Ramos (ver Ejemplo 9).

La inducción de CDC puede ensayarse utilizando métodos estándar bien conocidos, por ejemplo, la marcación de las células CXCR4+ tal como Ramos con un etiqueta fluorescente con el fin de evaluar la lisis CDC en la presencia de un suero humano. Un ensayo adecuado se explica en el Ejemplo 9.

Otras propiedades preferidas incluyen la ausencia de toxicidad significativa *in vivo* cuando los anticuerpos de la invención se administran y en la ausencia de otros efectos secundarios significativos *in vivo*.

Preferiblemente, las habilidades descritas en la presente se observan a un nivel miscible o significativo y más preferiblemente a un nivel estadísticamente significativo cuando se comparan con niveles de control apropiados.

Algunos anticuerpos son capaces ser internalizados en las células a las cuales se unen. De esta forma, en algunas modalidades de la invención los anticuerpos son capaces de ser internalizados. Esta propiedad es particularmente ventajosa para utilizarse en inmunoconjugados como cualquier otro agente acoplado a la molécula del anticuerpo deberá internalizarse con la molécula del anticuerpo. En otras modalidades no se ve ninguna internalización significativa.

El experto en la técnica estará consciente de las formas adecuadas para ensayar la internalización, por ejemplo utilizando marcación fluorescente

diferencial en temperatura en citometría de flujo o microscopía confocal. Un ejemplo de un ensayo adecuado involucra un anticuerpo secundario marcado con un tinte sensible al pH (tal como CypHer5E), que es mínimamente fluorescente a un pH básico (como se encuentra fuera de las células) y máximamente fluorescente a un pH ácido (como se encuentra dentro de las células).

El término "ligando" de CXCR4 incluye los ligandos naturales de CXCR4 tal como SDF-1, que puede naturalmente producirse, expresarse o sintetizarse recombinantemente en el laboratorio. Este término también incluye ligandos no naturales o modificados de CXCR4, tal como AMD-3100, que puede unirse a CXCR4.

Por "células CXCR4+" o "células que expresan CXCR4" significa células que expresan CXCR4 en su superficie, preferiblemente al menos sustancialmente en su conformación de tipo silvestre. Las células CXCR4+ pueden ser naturalmente positivas para CXCR4, o después pueden ser transformantes que expresan CXCR4 recombinante.

En vista de esta invención, por consiguiente, un intervalo de anticuerpos anti-CXCR4 puede hacerse y utilizarse en una variedad de modalidades, incluyendo en el tratamiento de cualquiera de los trastornos explicados en cualquier lugar en la presente, particularmente cáncer (incluyendo cáncer metastático), trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios e infecciones, en particular infecciones virales tales como VIH.

Como se utiliza en toda la solicitud, los términos "uno" y "una" se utilizan en el sentido de que significan "por lo menos uno", "por lo menos un primer", "uno o más", o "una pluralidad", de componentes o pasos referenciados, excepto en casos en donde la limitación superior a continuación se afirma específicamente. Por consiguiente, un "anticuerpo" como se utiliza en la presente, significa "por lo menos un primer anticuerpo". Los límites y parámetros operables de combinaciones, como con las cantidades de cualquier agente individual, serán conocidos por el experto en la técnica en vista de la presente descripción.

Las modalidades preferidas de la invención son composiciones que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótido que codifican los anticuerpos de la presente invención como se describen en la presente o sus partes o fragmentos, o moléculas de ácido nucleico sustancialmente homogéneas a la misma, forman aspectos adicionales de la

invención. Las moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican la secuencia de aminoácido explicada en SEC ID NO: 35 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 34), SEC ID NO: 46 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 45), SEC ID NO: 57 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 56), SEC ID NO: 68 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 67) o SEC ID NO: 101 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 100). Otras moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 69, 71, 73 ó 75 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 77, 79, 81 o 83) y/o comprenden secuencias que codifican una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 70, 72, 74, 76 ó 103 (que preferiblemente se codifica por SEC ID NO: 78, 80, 82, 84 ó 105). Los más preferidos son los ácidos nucleicos que codifican las siguientes combinaciones: SEC ID NOs: 69 y 70; o SEC ID NOs: 71 y 72; o SEC ID NOs: 73 y 74; o SEC ID NOs: 75 y 76; o SEC ID NOs: 69 y 103. También se prefieren moléculas de ácido nucleico que comprende las siguientes combinaciones: SEC ID NOs: 77 y 78; o SEC ID NOs: 79 y 80; o SEC ID NOs: 81 y 82; o SEC ID NOs: 83 y 84; o SEC ID NOs: 77 y 105.

Otras moléculas de ácido nucleico preferidas comprenden secuencias que codifican formas IgG de los anticuerpos de la invención, por ejemplo las descritas en el Ejemplo 4, o formas quiméricas de murino.

Como se indica anteriormente, otras moléculas de ácido nucleico abarcadas por la presente invención son aquellas que codifican parte o fragmentos de los anticuerpos humanos de la presente invención, por ejemplo, los que codifican una región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo (por ejemplo, aquellos que codifican SEC ID NO: 69, 71, 73 ó 75, tales como SEC ID NOs: 77, 79, 81 ó 83 respectivamente) o aquellos que codifican una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo (por ejemplo, aquellos que codifican SEC ID NO: 70, 72, 74, 76 ó 103, tal como SEC ID NO: 78, 80, 82, 84 ó 105 respectivamente). Otras moléculas de ácido nucleicos preferidas son aquellas que codifican una cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, las que codifican SEC ID NO: 108, 112, 116 ó 120, tal como SEC ID NOs: 106, 110, 114 ó 118 respectivamente) o las que codifican una cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo, aquellos que codifican SEC ID NO: 109, 113, 117, 121 ó 125 tal como SEC ID NOs: 107, 111, 115, 119 ó 123 respectivamente).

De esta forma, los fragmentos de los anticuerpos de la invención como se definen en la presente, o las secuencias sustancialmente homólogas a las mismas, o moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que codifican tales fragmentos forman aún otro aspecto de la invención.

Ventajosamente, los anticuerpos de la presente invención, cuando están en formato IgG, tienen una alta afinidad de unión para CXCR4, es decir, tienen un Kd en el intervalo de 1×10^{-8} M o 1×10^{-9} M o menor. De manera importantes, los anticuerpos con tal afinidad están en el intervalo establecido que ha sido demostrado que es útil para terapia.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención pueden unirse tanto a CXCR4 humano como CXCR4 de mono. Por ejemplo, los anticuerpos C-9P21, C1I24, D1K21, 9N10 y B-1M22 todos tienen esta capacidad. Tal reactividad cruzadas en las especies en particular entre humanos y especies comúnmente utilizadas como modelos de animal pre-clínicos, pueden ser una ventaja, ya que permite una traducción más efectiva de estudios preclínicos para uso clínico. Por ejemplo, teniendo un anticuerpo que reacciona de manera cruzada con el CXCR4 nativo presente en el modelo de animal particular utilizado significa que los resultados en este modelo más probablemente reflejará la situación en un paciente humano, por lo tanto permitiendo una evaluación más precisa de por ejemplo la dosificación que se va a hacer una probabilidad aumentada de identificar cualquier efecto potencialmente relevante o secundario problemático. Esto es especialmente el caso si el anticuerpo tiene una afinidad similar a ambos CXCR4 de mono y humano.

Por ejemplo, la habilidad de un anticuerpo de la invención a unirse a ambos CXCR4 humano y CXCR4 de mono significa que tales anticuerpos pueden ensayarse en estudios de toxicidad preclínicos para evaluar los efectos secundarios adversos del tratamiento y para encontrar las dosificaciones toleradas apropiadas.

Además, la habilidad de unirse a ambos CXCR4 de humano y CXCR4 de ratón significa que los resultados mostrados por tales anticuerpos de la invención en modelos de ratón, por ejemplo, modelos singeneicos de ratón utilizando ratones inmunocompetentes, más probablemente serán representativos de la actividad de los anticuerpos en sujetos humanos. La razón de esto es que los anticuerpos que pueden unirse a CXCR4 humano pero no a CXCR4 de ratón se unirán a CXCR4 expresado por la células tumorales humanas en modelos de ratón pero no serán capaces de unirse a CXCR4 de murino endógeno. Esto es por

supuesto diferente de la situación en un paciente humano, en donde el CXCR4 expresado por el tumor CXCR4 endógeno estaría presente.

La desventaja potencial con tal situación es que un anticuerpo que se une a CXCR4 humano pero no, o con una afinidad significativamente inferior a CXCR4 de ratón podría llevarse a cabo bien en un modelo de xenoinjerto de tumor humano en ratones inmunocomprometidos (por ejemplo, ratones desnudos o SCID) pero esto podría no verse reflejado por un rendimiento similar en un sistema humano en donde está presente mucho más CXCR4. En otras palabras, el efecto anti-tumoral visto en un sistema de xenoinjerto de ratón con un anticuerpo que puede unirse a CXCR4 humano pero en CXCR4 de ratón podría verse mejor que la realidad clínica. En contraste, cuando se trabaja con un anticuerpo que puede unirse tanto CXCR4 de humano como de ratón entonces esto se unirá a todas las formas de CXCR4 presentes en el sistema del modelo de ratón y probablemente será más representativo de la situación con el anticuerpo se pone en los humanos. Esto es especialmente el caso si el anticuerpo tiene una afinidad similar a ambos CXCR4 de murino y de humano.

En modalidades preferidas, los anticuerpos de la invención se unen a CXCR4 de humano y de mono o a CXCR4 de humano y de ratón o a CXCR4 de humano y mono y ratón con afinidades similares.

Por "afinidad similar" también significa que la afinidad de unión del anticuerpo para CXCR4 humano y para una o más de las otras especies de interés (por ejemplo, mono o ratón) es comparable, por ejemplo, no es más de un factor de 20 diferentes. Más preferiblemente la diferencia entre las afinidades de unión es menor de un factor de 15, más preferiblemente menor de un factor de 10, más preferiblemente menor de un factor de 5, 4, 3 ó 2. La comparación de las afinidades de unión puede llevarse a cabo a través de cualquier método apropiado. Para un ligando de superficie celular tal como CXCR4, los métodos de citometría de flujo tales como FACS proporcionan un método conveniente de comparación en donde las curvas de unión y, por ejemplo, los valores medios, pueden compararse, en este experimento. Un método apropiado se describe en el Ejemplo 5.

Sin embargo, en otras modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden no unirse a CXCR4 de mono y/o pueden no unirse a CXCR4 de ratón.

En las siguientes descripciones de las composiciones, immunoconjugados, farmacéuticos, combinaciones, cocteles, primero y segundos

usos médicos y todos los métodos de acuerdo con esta invención, los términos “anticuerpos” y “inmunoconjugados” o una región de unión a antígeno o uno de sus fragmentos, a menos que se afirme específicamente lo contrario o sea haga claro a partir de la terminología científica, se refieran al intervalo de anticuerpos anti-CXCR4 así como a anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21, y 9N10 específicos.

El términos “anticuerpo” y “inmunoglobulina”, como se utilizan en la presente se refieren ampliamente a cualquier agente o molécula de unión inmunológica que comprende un dominio de unión de antígeno humano, que incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos completos se asignan a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y los anticuerpos de la invención pueden estar en cualquiera de estas clases. Varios de estos además se dividen en subclases o isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulina son bien conocidas.

En general, en donde se utilizan anticuerpos completos en lugar de regiones de unión a antígeno en la invención, IgG y/o IgM son preferidos porque son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son más fáciles de hacer en una instalación de laboratorio. Los anticuerpos IgG1 son particularmente preferidos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos de mamífero se asignan a uno de los tipos claramente diferentes: kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácido de sus términos constantes y algunos aminoácidos de las regiones de cadena principal de sus dominios variables. Esencialmente no existe ninguna preferencia para utilizar en regiones constantes de cadena ligera κ o λ de los anticuerpos de la presente invención.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, los reactivos de unión inmunológicos abarcados por el término “anticuerpo” se extienden a todos los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos completos, anticuerpos diméricos, triméricos y multiméricos, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; anticuerpos recombinantes y modificados, y sus fragmentos.

El término “anticuerpo” de esta forma utilizado para referirse a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio individual (DAB, por sus siglas en inglés), dímero TandAbs, Fv, scFv (Fv de cadena individual), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, bicuerpos, tricuerpos (fusiones scFv-Fab, biespecíficas o triespecíficas, respectivamente); sc-diacuerpo; cuerpos kappa (lambda) (fusiones scFv-CL); Empleador de Célula T Biespecífico (BiTE) (tándems de scFv-scFv para atraer células T); el dominio variable doble (DVD)-Ig (formato biespecífico); inmunoproteína pequeña (SIP) (clase de minicuerpo); SMIP (dímero scFv-Fc “inmunofarmacéutico modular pequeño”); DART (diacuerpo ds-estabilizando “Re-Activación de Afinidad Doble”); miméticos de anticuerpo pequeño que comprenden una o más CDR y similar.

Las técnicas para preparar y utilizar varios constructos con base en anticuerpo y fragmentos son bien conocidas en la técnica (ver Kabat y *otros*, 1991, específicamente incorporada aquí por referencia). Los diacuerpos, en particular, además se describen en EP 404, 097 y WO 93/11161; a pesar de que los anticuerpos lineales además se describen en Zapata y *otros* (1995).

Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpo biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse a través de técnicas recombinantes o pueden sintetizarse químicamente. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpo son bien conocidas y se describen en la técnica. Por ejemplo, cada uno de Beckman y *otros*, 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall y *otros*, 2004; Reff & Heard, 2001; Reiter y *otros*, 1996; y Young y *otros*, 1995 además describen y permiten la producción de fragmentos de anticuerpo efectivos.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden producirse naturalmente o pueden completa o parcialmente producirse sintéticamente. De esta forma el anticuerpo puede ser de una fuente apropiada, por ejemplo, fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos o plantas transgénicas, o

en huevos utilizando tecnología IgY. De esta forma, las moléculas del anticuerpo pueden producirse *in vitro* o *in vivo*.

Preferiblemente, el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo (V_L) que comprende tres dominios CDR y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (V_H) que comprende tres dominios CDR. Tales V_L y V_H generalmente forman el sitio de unión a antígeno.

Un fragmento "Fv" es el fragmento del anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región tiene un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera en asociación y no covalente hermética. Es en esta configuración en donde las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables (CDR) confieren la especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

Sin embargo, está bien documentado en la técnica que la presencia de tres CDR del dominio variable de cadena ligera y tres CDR del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo no son necesarias para la unión al antígeno. De esta forma, los constructos más pequeños que el fragmento de anticuerpo clásico anterior se sabe que son efectivos.

Por ejemplo, los anticuerpos de camélido (Hamers-Casterman y otros, 1993; Arbabi Ghahroudi y otros, 1997) tienen un repertorio de unión a antígeno extenso pero están desprovistos de cadenas ligeras. También, los resultados con anticuerpos del dominio individual que comprenden dominios V_H solos (Ward y otros, 1989; Davies and Riechmann, 1995) o dominios V_L solos (van den Beucken y otros, 2001) muestran que estos dominios pueden unirse al antígeno con una aceptable alta afinidad. De esta forma, las tres CDR pueden efectivamente unirse al antígeno.

También se sabe que una sola CDR, o dos CDR, pueden efectivamente unirse al antígeno. Como un primer ejemplo, una sola CDR puede insertarse en una proteína heteróloga y conferir la habilidad de unión al antígeno en la proteína heteróloga, como se ejemplifica demostrando que una región CDR3 V_H insertada a la proteína heteróloga, tal como GFP, confieren la habilidad de unión al antígeno en la proteína heteróloga (Kiss y otros, 2006; Nicaise y otros, 2004).

Además se sabe que dos CDR pueden efectivamente unirse al

antígeno, y aún conferir propiedades superiores que las que posee por el anticuerpo progenitor. Por ejemplo, se ha demostrado (Qiu y otros, 2007) que dos CDR del anticuerpo progenitor (una región CDR1 VH y una región CDR3 VL) retienen las propiedades de reconocimiento del antígeno de la molécula progenitora pero tienen una capacidad superior para penetrar tumores. La unión de estos dominios CDR con una secuencia enlazadora apropiada (por ejemplo, FR2 VH) para orientar la CDR en una forma que se asemeja al anticuerpo progenitor nativo produjo aún un mejor reconocimiento del antígeno. Por consiguiente, se sabe en la técnica que es posible construir miméticos del anticuerpo de unión a antígeno que comprenden dos dominios CDR (preferiblemente uno un dominio VH y uno de un dominio VL, más preferiblemente, con uno de los dos dominios CDR siendo un dominio CDR3) orientado por medio de una región de cadena principal apropiada para mantener la conformación encontrada en el anticuerpo progenitor.

De esta forma, aunque los anticuerpos preferidos de la invención podrían comprender seis regiones CDR (tres de una cadena ligera y tres de una cadena pesada), los anticuerpos con menos de seis regiones CDR y tan pocas como una o dos regiones CDR están abarcadas por la invención. Además, los anticuerpos con CDR forman solamente la cadena pesada o la cadena ligera que también se contemplan.

Los anticuerpos preferidos de la invención que se unen a CXCR4 comprenden al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

- (a) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
- (b) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y
- (c) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; o
- (d) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
- (e) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(f) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; o

(g) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(h) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(i) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; o

(j) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

(k) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y

(l) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; o

Las regiones CDR de cadena ligera preferidas para utilizarse junto con las regiones CDR de cadena pesada especificadas se describen en cualquier lugar en la presente. Sin embargo, otras regiones variables de cadena ligera que comprenden tres CDR para utilizarse junto con las regiones variables de cadena pesada de la invención también se contemplan. Las regiones variables de cadena ligera apropiadas pueden utilizarse en combinación con las regiones variables de cadena pesada de la invención y que dan origen a un anticuerpo que se une a CXCR4 pueden fácilmente identificarse por un experto en la técnica.

Por ejemplo, una región variable de cadena pesada de la invención puede combinarse con una región variable de cadena ligera individual o un repertorio de regiones variables de cadena ligera y los anticuerpos resultantes se ensayan para la unión a CXCR4. Se esperaría que un número razonable de tales combinaciones de cada región variable de cadena pesada de la invención con diferentes regiones variables de cadena ligera retuvieran la habilidad de unirse a CXCR4. Ciertamente el anticuerpo 9N10 tiene la misma región variable de cadena pesada que C-9P21 pero una diferente región variable de cadena ligera.

Podrían utilizarse métodos similares para identificar regiones variables de cadena pesada alternativas para utilizarse en combinación con regiones variables de cadena ligera preferidas de la invención.

En ciertas modalidades, el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo

comprende todas o una porción de la región constante de cadena pesada tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada IgG1 o una de sus porciones. Además, el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo pueden comprender toda o una porción de la región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda, o una de sus porciones. Toda o parte de las regiones constantes pueden producirse naturalmente, o pueden ser completa o parcialmente sintéticas. Las secuencias apropiadas para tales regiones constantes son bien conocidas y están documentadas en la técnica. Cuando se incluye un complemento completo de regiones constantes de las cadenas pesada y ligera en los anticuerpos de la invención, tales anticuerpos son típicamente referidos en la presente como anticuerpos "de longitud completa" o anticuerpos "completos".

Los anticuerpos que contienen una región Fc son preferidos para ciertos usos, particularmente usos terapéuticos *in vivo*, en donde la región FC media las funciones efectoras tales como ADCC. Las regiones Fc apropiadas serían bien conocidas para un experto en la técnica y pueden seleccionarse por consiguiente.

El término "sustancialmente homólogo" como se utiliza en la presente en conexión con una secuencia de aminoácido o ácido nucleico incluye secuencias que tienen por lo menos 70% o 75%, preferiblemente al menos 80%, y aún más preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácido o ácido nucleico descrita. Las secuencias sustancialmente homólogas de la invención de esta forma incluyen bases individuales o múltiples o alteraciones de aminoácido (adiciones, sustituciones, inserciones o eliminaciones) a las secuencias de la invención. Al nivel del aminoácido las secuencias sustancialmente homólogas preferidas contienen solamente hasta 1, 2, 3, 4 ó 5, preferiblemente hasta 1, 2 ó 3, más preferiblemente hasta 1 ó 2, aminoácidos alterados, en una o más de las regiones de cadena principal y/o una o más de las CDR que forman las secuencias de la invención. Tales alteraciones pueden estar con aminoácidos conservadores o no conservadores. Preferiblemente tales alteraciones son sustituciones de aminoácido conservadoras.

Las secuencias de ácido nucleico sustancialmente homólogas también incluyen secuencias de nucleótido que hibridan las secuencias de ácido nucleico descritas (o sus secuencias complementarias), por ejemplo, hibridan a

secuencias de nucleótido que codifican una o más de las CDR de cadena ligera o cadena pesada de la invención, las regiones variables de cadena ligera o pesada de la invención, o los anticuerpos de la invención (o hibridan a sus secuencias complementarias), bajo al menos condiciones de hibridación moderadamente estrictas.

El término “sustancialmente homólogo” también incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácido y nucleótido de la presente invención que llevan a cabo sustancialmente la misma función que las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención es sustancialmente la misma forma. Por ejemplo, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo (o el ácido nucleico sustancialmente homólogo que la codifica) deberán retener la habilidad de unirse a CXCR4 como se describe anteriormente. Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo deberá retener una o más de las capacidades funcionales del anticuerpo, por ejemplo, como se define en cualquier lugar en la presente. Preferiblemente, cualquier anticuerpo sustancialmente homólogo deberá retener la habilidad de específicamente unirse al mismo epítipo de CXCR4 como se reconoce por el anticuerpo en cuestión, por ejemplo, el mismo epítipo reconocido por los dominios CDR de la invención o los dominios VH y VL de la invención como se describe en la presente. La unión al mismo epítipo/antígeno puede fácilmente ensayarse a través de métodos bien conocidos y descritos en la técnica, por ejemplo, utilizando ensayos de unión, por ejemplo, un ensayo de competencia. La retención de estas propiedades funcionales también puede fácilmente ensayarse a través de los métodos bien conocidos y descritos en la técnica. Para los anticuerpos de la presente invención es particularmente preferido que las propiedades antagónicas y/o la propiedad de no inducción de apoptosis se retengan.

De esta forma, un experto en la técnica apreciará que los ensayos de unión pueden utilizarse para ensayar si los anticuerpos “sustancialmente homólogos” tienen las mismas especificidades de unión que los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo de la invención, por ejemplo, los ensayos de unión tales como citometría de flujo, ensayos ELISA o ensayos BIAcore que pueden fácilmente utilizarse para establecer si tales anticuerpos “sustancialmente homólogos” pueden unirse a CXCR4. La citometría de flujo en células es el ensayo más conveniente para analizar la unión a un receptor de superficie celular tal como CXCR4. Como se describe anteriormente, un ensayo de unión de competencia puede utilizarse para ensayar si los anticuerpos “sustancialmente

homólogos” retienen la habilidad para específicamente unirse a sustancialmente el mismo epítipo de CXCR4 como se reconoce por los anticuerpos de la invención. El método descrito anteriormente es solamente un ejemplo de un ensayo de competencia adecuado. El experto en la técnica estará consciente de otros métodos y variaciones adecuadas.

Las secuencias de proteínas sustancialmente homólogas de la invención incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácido conservadoras, o por ejemplo, alteraciones que no se efectúan en los VH, VL o CDR de los anticuerpos, por ejemplo, incluye anticuerpos scFv en donde se utiliza una diferente secuencia enlazadora o anticuerpos en donde las secuencias de etiqueta u otros componentes se agregan que contribuyen a la unión del antígeno, o las alteraciones para convertir un tipo o formato de molécula de anticuerpo o fragmento en otro tipo o formato de molécula de anticuerpos o fragmento (por ejemplo, la conversión de Fab a scFv o vice versa), o la conversión de una molécula de anticuerpo a una clase o subclase particular de molécula de anticuerpo (por ejemplo, la conversión de una molécula de anticuerpo de IgG o una de sus clases, por ejemplo, IgG1 o IgG3).

Una “sustitución de aminoácido conservadora”, como se utiliza en la presente, es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tiene cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin cargar (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

La homología puede evaluarse a través de un método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de homología entre secuencias, los programas de computadora que hacen múltiples alineaciones de secuencias son útiles, por ejemplo, Clustal W (Thompson y *otros*, 1994). Si se desea, el algoritmo Clustal W puede utilizarse junto con la matriz de clasificación BLOSUM 62 (Henikoff and Henikoff, 1992) y la penalidad de abertura de hueco de 10 y una penalidad de extensión de hueco de 0.1, de tal forma que la coincidencia en el

orden más alto se obtiene entre dos secuencias en donde por lo menos 50% de la longitud total de una de las secuencias está involucrada en la alineación. Otros métodos que pueden utilizarse para alinear secuencias son el método de alineación de Needleman y Wunsch (1970), como se revisa por Smith y Waterman (1981), de tal forma que la coincidencia de orden más alto se obtiene entre las dos secuencias del número de aminoácidos idénticos se determina entre las dos secuencias. Otros métodos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido son generalmente reconocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Carillo y Lipton (1988) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects.

Generalmente, los programas de computadora se emplearan para tales cálculos. Los programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers and Miller, 1988), FASTA (Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990) y BLAST con huecos (Altschul y otros, 1997), BLASTP, BLASTN, o GCG (Devereux y otros, 1984) también útiles para este propósito. Además, el servidor Dali en el Instituto de Bioinformáticas Europeo ofrece alineaciones con base en las estructuras de las secuencias de proteína (Holm, 1993; 1995; 1998).

Para proporcionar un punto de referencia, las secuencias de acuerdo con la presente invención que tienen 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología, identidad de secuencia, etc., pueden determinarse utilizando el programa ALIGN con parámetros o por omisión (por ejemplo, disponible en Internet en el servidor en red GENESTREAM, IGH, Montpellier, Francia).

Por "condiciones de hibridación al menos moderadamente estrictas" significa que las condiciones se seleccionan para promover la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación puede ocurrir en toda o una porción de la molécula de la secuencia de ácido nucleico. La porción de hibridación es típicamente al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30, 40 ó 50) nucleótidos en longitud. Los expertos en la técnica reconocerán la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, se determina por T_m , que en reguladores de pH que contienen sodio es una función de la concentración del ión sódico y la temperatura ($T_m = 81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 (\text{Log}10 [\text{Na}^+]) + 0.41(\%(\text{G}+\text{C}) - 600/\text{l})$, o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad híbrida son la concentración del ión del sodio y la temperatura. Con el fin de identificar

moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida, una falta de coincidencia de 1% puede asumirse que resulta de aproximadamente un aumento de un grado en T_m . Por ejemplo, si se buscan moléculas de ácido nucleico que tienen >95% de identidad, la temperatura de lavado final se reducirá en aproximadamente 5°C. Con base estas consideraciones los expertos en la técnica serán capaces de fácilmente seleccionar las condiciones de hibridación apropiadas. En modalidades preferidas, las condiciones de hibridación estrictas se seleccionan. A manera de ejemplo, se pueden utilizar las siguientes condiciones para obtener una hibridación estricta: hibridación a 5x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5x solución de Denhardt/1.0% de SDS a $T_m - 5^\circ\text{C}$ con base en la ecuación anterior, seguido por un lavado de 0.2x SSC/0.1% de SDS a 60°C. Las condiciones de hibridación moderadamente estrictas incluyen un paso de lavado en 3x SSC a 42°C. A manera de un ejemplo adicional, las secuencias que “hibridan” son aquellas secuencias que se unen (hibridan) bajo condiciones no estrictas (por ejemplo, 6 x SSC, 50% de formamida a temperatura ambiente), y lavado bajo condiciones de bajo rigor (por ejemplo, 2 x SSC, temperatura ambiente, más preferiblemente 2 x SSC, 42°C) o condiciones de un rigor más alto (por ejemplo, 2 x SSC, 65°C) (en donde SSC = 0.15M de NaCl, 0.015M de citrato de sodio, pH 7.2).

Se entiende, sin embargo, que los rigores equivalentes pueden obtenerse utilizando reguladores de pH, sales y temperaturas alternativas. Las instrucciones adicionales con respecto a las condiciones de hibridación pueden encontrarse en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1–6.3.6 y en: *Sambrook y otros, Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol.3.

Generalmente hablando, las secuencias que hibridan bajo condiciones de alto rigor son preferidas, como son secuencias que, para la degeneración del código, hibridarían bajo altas condiciones de rigor.

En otras modalidades preferidas, los anticuerpos de la segunda generación son provistos que tienen propiedades mejoradas o superiores en comparación con un anticuerpo anti-CXCR4 original, tales como C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 ó 9N10. Por ejemplo, los anticuerpos de la segunda generación puede tener una afinidad de unión más fuerte para CXCR4, un perfil de reactividad cruzada superior, inducir aún niveles inferior de apoptosis de células CXCR4+, una habilidad superior para activar células CXCR4+, particularmente células tumorales, por ejemplo, una habilidad mejorada para inhibir el crecimiento de

células tumorales, una habilidad antagónica mejorada, por ejemplo, una habilidad mejorada para bloquear el influjo de Ca inducido por la unión de SDF-1 a CXCR4, una inhibición mejorada de la migración inducida por el ligando, o una habilidad mejorada para inducir ADCC o CDC, dependiendo de la aplicación, o un tratamiento mejorado de los trastornos explicados en cualquier lugar en la presente.

Las comparaciones para identificar los anticuerpos de la segunda generación efectivos fácilmente se conducen y cuantifican, por ejemplo, utilizando uno o más de los varios ensayos descritos en detalle en la presente o en la técnica. Los anticuerpos de la segunda generación que tienen una propiedad o actividad biológica mejorada de por lo menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces y preferiblemente al menos 50 veces, en comparación con los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente invención, se ejemplifican a través de los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21, o 9N10, y están abarcados por la presente invención. Los anticuerpos de la segunda generación particularmente preferidos comprenden cadenas VH de los anticuerpos de la presente invención, o sus CDR VH, combinados con cadenas VL (o CDR VL alternativas).

El anticuerpo, la proteína de unión, y las moléculas de ácido nucleico de la invención son generalmente moléculas “aisladas” o “purificadas” mientras se distinguen de cualquiera de tales componentes que pueden estar presentes *in situ* dentro de un cuerpo humano o de animal o en una muestra de tejido derivada de un cuerpo de humano o animal. Las secuencias, sin embargo, pueden corresponder a o ser sustancialmente homólogas a las secuencias como se encuentran en el cuerpo del humano o animal. De esta forma, el término “aislado” o “purificado” como se utiliza en la presente hacen referencia a moléculas o secuencias de ácido nucleico y proteínas o polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, y se refieren a tales moléculas cuando se aíslan, purifican de, o están sustancialmente de su entorno natural, por ejemplo, aisladas de o purificadas del cuerpo de humano o animal (si ciertamente son de existencia natural) o se refieren a tales moléculas como se producen a través de un proceso técnico, es decir, incluyen moléculas recombinantes o sintéticamente producidas.

De esta forma, cuando se utilizan en conexión con una molécula de ácido nucleico, tales términos pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente libre de material con el cual está naturalmente asociado tales como otros ácidos nucleicos/genes o polipéptidos. Estos términos también pueden referirse a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de

cultivo cuando se producen a través de técnicas de ADN recombinantes, o están sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico aislado purificado también puede estar sustancialmente libre de secuencias que naturalmente flanquean el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del cual se deriva el ácido nucleico o las secuencias que han sido hechas para flanquear el ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de etiqueta, u otras secuencias que no tienen un valor terapéutico) a través de, por ejemplo, modificación genética.

De esta forma, cuando se utilizan en conexión con una molécula de proteína o polipéptido tales como las CDR 1, 2 y 3, de cadena ligera, las CDR 1, 2 y 3, de cadena pesada, las regiones variables de cadena pesada, y las proteínas de unión o los anticuerpos de la invención, que incluyen anticuerpos de longitud completa, el término "aislado" o "purificado" típicamente se refiere a una proteína sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de la cual se deriva. En algunas modalidades, particularmente en donde la proteína se va administrar a humanos o animales, tales proteínas aislados o purificadas están sustancialmente libres del medio de cultivo cuando se producen a través de técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. Tales proteínas aisladas o purificadas también pueden estar libres de secuencias de flanqueo tales como aquellas descritas anteriormente para moléculas de ácido nucleico aisladas.

El término "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de nucleósido o monómeros de nucleótido compuestos de bases, azúcares y enlaces inter-azúcar de existencia natural (cadena principal). El término también incluye secuencias modificadas sustituidas que comprenden monómeros de existencia no natural o una de sus porciones. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser secuencias de ácido de desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de existencia natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza y deaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser monocatenarias o bicatenarias. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser completa o parcialmente sintéticas o recombinantes.

En modalidades preferidas los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente anticuerpos completamente humanos. A este respecto, los anticuerpos humanos generalmente tienen por lo menos tres ventajas potenciales para utilizarse en terapia para humanos. En primer lugar, el sistema inmunitario humano no deberá reconocer el anticuerpo como foráneo. En segundo lugar, la vida media en la circulación humana será similar a los anticuerpos humanos de existencia natural, permitiendo dosis más pequeñas y menos frecuentes a ser dadas. En tercer lugar, debido a la porción efectora es humana, en modalidades en donde el modo de acción involucra la aniquilación de las células objetivo, interactuará mejor con las otras partes del sistema inmunitario, por ejemplo, para destruir células objetivo más eficientemente a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

Sin embargo, aunque los anticuerpos humanos generalmente se reconocen por desplegar estas ventajas, se sabe que el desarrollo de anticuerpos humanos que tienen afinidades lo suficientemente altas y propiedades funcionales apropiadas para convertirlos en candidatos para terapia humana exitosa es a través de medios no directos. Por consiguiente la técnica aún carece de anti-CXCR4 para el tratamiento seguro y efectivo de humanos y posee retos en el desarrollo de tales agentes.

El término "humano" como se utiliza en la presente en conexión con moléculas de anticuerpo y proteínas de unión en primer lugar se refiere a anticuerpos y proteínas de unión que tienen regiones variables (por ejemplo, regiones V_H, V_L, CDR o FR) y, opcionalmente, regiones de anticuerpo constante, aisladas o derivadas de un repertorio humano o derivadas o correspondientes a secuencias encontradas en humanos o repertorios humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o células somáticas. Los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21, y 9N10 de la invención son ejemplos de tales moléculas de anticuerpo humanas en donde las regiones variables han sido aisladas de un repertorio humano.

Los anticuerpos "humanos" y las proteínas de unión de la invención además incluyen residuos de aminoácido no codificados por las secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas el sitio *in vitro*, por ejemplo, mutaciones introducidas por clonación o PCR *in Vitro*. Los ejemplos particulares de tales mutaciones son mutaciones que involucran sustituciones conservadoras u otras mutaciones en un pequeño número

de residuos del anticuerpo o la proteína de unión, por ejemplo, en hasta 5, 4, 3, 2 ó 1 de los residuos del anticuerpo o proteína de unión, preferiblemente por ejemplo en hasta 5, 4, 3, 2 ó 1 de los residuos que forman una o más de las CDR en el anticuerpo a la proteína de unión. Ciertos ejemplos de tales anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos y regiones variables que han sido sometidas a técnicas de modificación estándar para reducir la cantidad de sitios potencialmente inmunogénicos.

De esta forma, los anticuerpos "humanos" de la invención incluyen secuencias derivadas de y relacionadas con secuencias encontradas en humanos, pero pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*. Además, los anticuerpos humanos y las proteínas de unión de la presente invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de consenso humanas identificadas de secuencias humanas, o secuencias sustancialmente homólogas a las secuencias humanas.

Además, los anticuerpos humanos y las proteínas de unión de la presente invención no están limitados a las combinaciones de las regiones de V_H, V_L, CDR o FR que por sí mismas se encuentran en combinación en las moléculas del anticuerpo humano. De esta forma, los anticuerpos humanos y las proteínas de unión de la invención pueden incluir o corresponder a combinaciones de tales regiones que no necesariamente existen naturalmente en humanos.

En modalidades preferidas, los anticuerpos humanos serán anticuerpos completamente humanos. Anticuerpos "completamente humanos" como se utiliza en la presente, son anticuerpos que comprenden dominios de región variable "humanos" y/o CDR, como se define anteriormente, sin secuencias de anticuerpo sustanciales no humanas, o sin ninguna secuencia de anticuerpo no humana. Por ejemplo, los anticuerpos que comprenden dominios de región variable humano y/o CDR "sin secuencias de anticuerpo no humanas sustanciales" son anticuerpos, dominios y/o CDR en donde solamente hasta 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácidos son aminoácidos que no se codifican por las secuencias del anticuerpo humano. De esta forma, los anticuerpos "completamente humanos" se distinguen de los anticuerpos "humanizados", que se basan en dominios de región variable sustancialmente no humanas, por ejemplo, los dominios de la región variable de ratón, en donde ciertos aminoácidos han sido cambiados para corresponder mejor a los aminoácidos típicamente presentes en los anticuerpos humanos.

Los anticuerpos "completamente humanos" de la invención pueden

ser dominios de la región variable humana y/o CDR sin ninguna otra secuencia de anticuerpos sustancial, tales como siendo anticuerpos de cadena individual. Alternativamente, los anticuerpos “completamente humanos” de la invención pueden ser dominios de la región variable humana y/o CDR integrales con u operativamente acoplados a una o más de las regiones constantes del anticuerpo humano. Ciertos anticuerpos completamente humanos preferidos son los anticuerpos IgG con el complemento de las regiones constantes IgG.

En otras modalidades, los anticuerpos “humanos” de la invención serán anticuerpos quiméricos en parte humanos. Los anticuerpos “quiméricos en parte humanos” como se utiliza en la presente son anticuerpos que comprenden dominios de región variable “humanos” y/o CDR operativamente acoplados a, o injertados en, un región constante de una especie no humana, tal como de rata o ratón. Tales anticuerpos quiméricos en parte humanos pueden utilizarse, por ejemplo, en estudios pre-clínicos, en donde la región constante preferiblemente será de la misma especie del animal utilizado en el ensayo pre-clínico. Estos anticuerpos quiméricos en parte humanos pueden también utilizarse, por ejemplo, en diagnósticos *ex vivo*, en donde la región constante de la especie no humana puede proporcionar opciones adicionales para la detección del anticuerpo.

El término “fragmento” como se utiliza en la presente se refiere a los fragmentos de relevancia biológica, por ejemplo, fragmentos que contribuyen a la unión del antígeno, por ejemplo, forman parte del sitio de unión a antígeno, y/o contribuyen a la inhibición o reducción en función del antígeno CXCR4. Ciertos fragmentos preferidos comprenden una región variable de cadena pesada (dominio V_H) y/o una región variable de cadena ligera (dominio V_L) de los anticuerpos de la invención. Otros fragmentos preferidos comprenden una o más de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos de la invención (o de los dominios V_H de la invención), o una o más de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos de la invención (o de los dominios V_L de la invención). Ciertos fragmentos preferidos son al menos de 5 aminoácidos en longitud y comprenden por lo menos una región CDR, preferiblemente una región CDR3, más preferiblemente una región CDR3 de cadena pesada.

En modalidades en donde los anticuerpos de la invención comprenden un fragmento de cualquiera de las secuencias definidas (por ejemplo, comprende un fragmento de SEC ID NO:35, 46, 57, 68 ó 101), por ejemplo, los anticuerpos comprenden los dominios V_H y/o V_L de la invención, o son anticuerpos o proteínas de unión que comprenden una o más CDR de la invención, en todas

estas regiones/dominios generalmente se separan dentro del anticuerpo o la proteína de unión de tal forma que cada región/dominio puede llevar a cabo su función biológica y por lo tanto la contribución a la unión del antígeno se retiene. De esta forma, los dominios V_H y V_L preferiblemente se separan a través de secuencias de andamio apropiadas/secuencias enlazadoras y las CDR preferiblemente se separan a través de regiones de cadena principal apropiadas tales como las encontradas en anticuerpos de existencia natural y/o anticuerpos modificados efectivos. De esta forma, las secuencias V_H , V_L y CDR individuales de la invención preferiblemente son provistas dentro de o incorporadas en una cadena principal apropiada o andamio para permitir la unión del antígeno. Las secuencias o regiones de cadena principal pueden corresponder a regiones de cadena principal de existencia natural, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, según sea apropiado para formar un andamio apropiado, o pueden corresponder a regiones de cadena principal de consenso, por ejemplo, identificadas a través de la comparación de varias regiones de cadena principal de existencia natural. Alternativamente, los andamios o cadenas principales no del anticuerpo, por ejemplo, cadenas principales del receptor de célula T pueden utilizarse.

Las secuencias apropiadas que pueden utilizarse para las regiones de cadena principal son bien conocidas y están documentadas en la técnica y cualquiera de estas puede utilizarse. Las secuencias preferidas para regiones de cadena principal son una o más (es decir, una, dos, tres, o cuatro) de las regiones de cadena principal que forman los dominios V_H y/o V_L de la invención, es decir, uno o más de las regiones de cadena principal descritas en las Tablas 1, 2, 3, 4 ó 5, o regiones de cadena principal sustancialmente homólogas a la misma, y en particular regiones de cadena principal que permiten el mantenimiento de la especificidad del antígeno, por ejemplo, regiones de cadena principal que resultan en sustancialmente la misma o la misma estructura 3D del anticuerpo.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro de las cadenas ligeras variables (SEC ID NOs: 30, 31, 32 y 33) y/o la cadena pesada variable (SEC ID NOs: 25, 26, 27 y 28), según apropiado, las regiones FR de SEC ID NO: 35 (también mostrada en la Tabla 1), o las regiones FR sustancialmente homólogas a la misma, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro de la cadena ligera variable (SEC ID NOs: 41, 42, 43 y 44) y/o la cadena pesada variable (SEC ID NOs: 36, 37, 38 y 39), según sea apropiado, las regiones FR de SEC ID NO: 46 (también mostrada en la Tabla 2), o las regiones FR sustancialmente homólogas a

la misma, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro de la cadena ligera variable (SEC ID NOs: 52, 53, 54 y 55) y/o la cadena pesada variable (SEC ID NOs: 47, 48, 49 y 50), según sea apropiado, las regiones FR de SEC ID NO: 57 (también mostrada en la Tabla 3), o las regiones FR sustancialmente homólogas a la misma, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro de la cadena ligera variable (SEC ID NOs: 63, 64, 65 y 66) y/o la cadena pesada variable (SEC ID NOs: 58, 59, 60 y 61), según sea apropiado, las regiones FR de SEC ID NO: 68 (también mostrada en la Tabla 4), o las regiones FR sustancialmente homólogas a la misma, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

En ciertas modalidades preferidas, las cuatro de la cadena ligera variable (SEC ID NOs: 96, 97, 98 y 33) y/o la cadena pesada variable (SEC ID NOs: 25, 26, 27 y 28), según sea apropiado, las regiones FR de SEC ID NO: 101 (también mostrada en la Tabla 5), o las regiones FR sustancialmente homólogas a la misma, se encuentran en los anticuerpos de la invención.

Además, aunque los anticuerpos preferidos de la invención se forman de V_H , V_L o CDR de la invención, se debe observar que los anticuerpos de la invención también abarcan uno o más de V_H , V_L o CDR de la invención en combinación con otros V_H , V_L o CDR no de la invención, siempre que las propiedades de unión de CXCR4 o las propiedades anti-CXCR4 de los anticuerpos de la invención como se describen en la presente estén aún presentes.

El término "región determinante de complementariedad de cadena pesada" ("CDR de cadena pesada") como se utiliza en la presente se refieren a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada (dominio V_H) de un molécula de anticuerpo. La región variable de cadena pesada tiene tres CDR denominadas CDR1 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada, y CDR3 de cadena pesada del término amino al término carboxi. La región variable de cadena pesada también tiene cuatro regiones de cadena principal (FR1, FR2, FR3 y FR4 del término amino al término carboxi). Estas regiones de cadena principal separan las CDR.

El término "región variable de cadena pesada" (dominio V_H) como se utiliza en la presente se refiere a la de la región variable de una cadena pesada de una molécula del anticuerpo.

El término "región determinante de complementariedad de cadena

ligera" ("CDR de cadena ligera") como se utiliza en la presente se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro la región variable de cadena ligera (dominio V_L) de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de cadena ligera tienen tres CDR denominadas CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, y CDR3 de cadena ligera del término amino al término carboxi. La región variable de cadena ligera tiene cuatro regiones de cadena principal (FR1, FR2, FR3 y FR4 del término amino al término carboxi). Estas regiones de cadena principal separan las CDR.

El término "región variable de cadena ligera" (dominio V_L) como se utiliza en la presente se refiere a la acción variable de una cadena ligera de una molécula de anticuerpo.

Se debe observar que la nomenclatura de Kabat es seguida en la presente, en donde cuando es necesario, con el fin de definir la colocación de las CDR (Kabat y otros, 1991, incorporada específicamente en la presente por referencia).

Un experto en la técnica apreciará las proteínas y los polipéptidos de la invención, tales como las CDR ligera y pesada, las regiones variables de cadena ligera y pesada, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpo, y los inmunoconjugados, pueden prepararse en cualquiera de varias formas bien conocidas y descritas en la técnica, pero más preferiblemente se preparan utilizando métodos recombinantes. Los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos de la invención pueden derivarse o producirse a través de cualquier método apropiado, por ejemplo, por clonación o por síntesis. Tales secuencias podrían, por ejemplo, prepararse a través de la clonación de secuencias apropiadas de, por ejemplo, los genes de la línea germinal humana y haciéndoles cualquier modificación necesaria a las secuencias de la línea germinal para obtener las secuencias de la invención utilizando los métodos bien conocidos y descritos en la técnica. Un método alternativo y más eficiente sería sintetizar la secuencia de región variable de cadena ligera o cadena pesada apropiada como cebadores de traslape, y utilizando la extensión del cebador para obtener la secuencia completa. Esta secuencia completa después podría amplificarse a través de PCR con cebadores que contienen sitios de restricción apropiados para además la clonación y la manipulación, por ejemplo para clonar en un vector de expresión apropiado. De 5 a 7 cebadores de traslape por región variable normalmente es suficiente, por lo tanto hacienda esta técnica muy eficiente y

precisa.

Una vez que los fragmentos de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos de la invención han sido obtenidos, estos fragmentos pueden además manipularse a través de técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, para convertir los fragmentos de la región variable en moléculas de anticuerpo de longitud completa con dominios de región constante apropiados, o formatos particulares de los fragmentos de anticuerpos publicados en cualquier lugar en la presente, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos scFv, etc. Típicamente, o como parte de este procedimiento de manipulación adicional, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las moléculas del anticuerpo de la invención generalmente se incorporan en un vector de expresión apropiado con el fin de facilitar la producción de los anticuerpos de la invención.

Los posibles vectores de expresión incluyen pero no se limitan a cósmidos, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus, y virus asociado con adeno), mientras el vector sea compatible con la célula hospedera utilizada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula hospedera", que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas sobre la base de las células hospederas a ser utilizadas para la expresión, están operativamente enlazadas a la molécula de ácido nucleico. Operativamente enlazado pretende significar que el ácido nucleico está enlazado a secuencias reguladoras en una forma que permite la expresión del ácido nucleico.

Por consiguiente la invención contempla un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o uno de sus fragmentos, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluyendo bacterias, hongos, virales, mamíferos o genes de insecto (por ejemplo, ver las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, 1990). La selección de las secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedera selecciona como se explicó anteriormente, y puede fácilmente lograrse a través de un experto en la técnica. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor de transcripción y un potenciador o secuencia

de inhibición de polimerasa de ARN; una secuencia de unión a rizoma, incluyendo una señal de iniciación de traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula hospedera seleccionada y el vector utilizado, otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren un grado de inducción de transcripción pueden incorporarse en el vector de expresión.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de las células hospederas transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican una proteína tal como neomicina e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa o una inmunoglobulina o una de sus porciones tal como la porción Fc de una inmunoglobulina preferiblemente IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se monitorea mediante los cambios en la concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que confiera resistencia a antibiótico tal como resistencia a neomicina las células transformadas puede seleccionarse con G418. Las células que se han incorporado al gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras las otras células mueren. Esto hace posible visualizar y ensayar la expresión de los vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación en la expresión y el fenotipo. Se apreciará que los marcadores seleccionables pueden introducirse en un vector separado desde el ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener genes que codifican una fracción de fusión que proporciona la expresión aumentada de la proteína recombinante; la solubilidad aumentada de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante objetivo mediante la acción como un ligando en la purificación por afinidad (por ejemplo, las "etiquetas" apropiadas para permitir la purificación y/o identificación pueden estar presentes, por ejemplo, etiquetas His o etiquetas myc). Por ejemplo, se puede agregar un sitio de separación proteolítica a la proteína recombinante objetivo para permitir la separación de la proteína recombinante de la fracción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia),

pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatona S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante.

Los vectores de expresión recombinantes pueden introducirse en las células hospederas para producir una célula hospedera transformada. Los términos “transformado con”, “transfectado con”, “transformación” y “transfección” pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula a través de una de muchas posibles técnicas conocidas en la técnica. El término “célula hospedera transformada” como se utiliza en la presente pretende también incluir células capaces de glicosilación que han sido transformadas con un vector de expresión recombinante de la invención. Las células procarióticas pueden transformarse con ácido nucleico a través de, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro y calcio. Por ejemplo, el ácido nucleico puede introducirse en las células de mamífero a través de técnicas convencionales tales como fosfato cálcico o co-precipitación de cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrina, lipofección, electroporación o microinyección. Los métodos adecuados para transformar y transfectar células hospederas pueden encontrarse en Sambrook y otros, 1989, y otros libros de texto de laboratorio.

Las células hospederas adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospederas eucariotas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células de levadura o células de mamífero. Otras células hospederas adecuadas pueden encontrarse en Goeddel, 1990. Además, las proteínas de la invención pueden expresarse en células procariotas, tales como *Escherichia coli* (Zhang y otros, 2004).

Las células hospederas de levadura y hongos adecuados para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limita a, *Saccharomyces cerevisiae*, el género *Pichia* o *Kluyveromyces* y varias especies del género *Aspergillus*. Los ejemplos de vectores para expresión de levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari y otros, 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982), pJRY88 (Schultz y otros, 1987), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los protocolos para la transformación de la levadura y los hongos son bien conocidos por el experto en la técnica (ver Hinnen y otros, 1978; Ito y otros, 1983, y Cullen y otros 1987).

Las células de mamífero adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen, entre otras: células COS (por ejemplo, ATCC No. CRL 1650 ó

1651), BHK (por ejemplo, ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573), NS-1, NS0 (ATCC CRL-11177), y Per.C6® (Crucell, Leiden, países bajos). Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero generalmente incluyen un promotor (por ejemplo, derivados del material viral tal como poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40), así como otras secuencias de control de transmisión y traducción. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B., 1987) y pMT2PC (Kaufman y otros, 1987).

Dadas las enseñanzas provistas en la presente, los promotores, terminadores y métodos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado de una planta, células aviares y de insectos también pueden fácilmente lograrse. Por ejemplo, dentro de una modalidad, las proteínas de la invención pueden expresarse de las células de planta (ver Sinkar y otros, 1987, cuya revisión utiliza vectores rizógenos de *Agrobacterium*; ver también Zambryski y otros, 1984, que describe el uso de vectores de expresión para células de plantas, incluyendo, entre otras, PAPS2022, PAPS2023, y PAPS2034).

Las células de insecto adecuadas para llevar a cabo la presente invención incluyen células y líneas de células de las especies *Bombyx*, *Trichoplusia* o *Spodoptera*. Los vectores de *Baculovirus* disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (células SF 9) incluyen las series pAc (Smith y otros, 1983) y las series pVL (Luckow y Summers 1989). Algunos sistemas de expresión de células de *baculovirus*-insecto adecuadas para expresión de proteínas recombinantes de la invención se describen en PCT/US/02442.

Alternativamente, las proteínas de la invención también pueden expresarse en animales transgénicos no humanos tales como ratas, conejos, ovejas y puercos (Hammer y otros 1985; Palmiter y otros 1983; Brinster y otros 1985; Palmiter and Brinster 1985, y Patente de E. U. A. No. 4,736,866).

Las proteínas de la invención también pueden prepararse a través de síntesis química utilizando técnicas bien conocidas en la química de las proteínas tales como la síntesis de fase sólida (Merrifield (1964); Frishe y otros, 1996) o la síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, 1987).

Las proteínas de fusión N-terminal o C-terminal que comprenden los anticuerpos y proteínas de la invención conjugadas con otras moléculas tales como proteínas, pueden prepararse mediante la fusión a través de técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen un anticuerpo o

proteína de la invención fusionado a la proteína seleccionada o la proteína marcadora, o la proteína de etiqueta como se describe en la presente. Los anticuerpos o proteínas de la invención también pueden conjugarse con otras proteínas a través de técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden acoplarse utilizando enlazadores que contienen tiol heterobifuncional como se describe en WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionat) o N-succinimidil-5 tioacetato. Los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse para preparar proteínas de fusión o conjugados incluyen proteínas de unión a célula tales como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, lipoproteína de baja densidad, glucagón, endorfinas, transferrinas, bombesina, asialoglicoproteína glutatona-S-transferasa (GST), hemaglutinina (HA), y myc truncada.

Independientemente de la forma de preparación de un primer segmento de ácido nucleico del anticuerpo anti-CXCR4, los segmentos de ácido nucleico de anticuerpo adecuados adicionales pueden fácilmente prepararse a través de técnicas de biología molecular estándar. Con el fin de confirmar que cualquier segmento de ácido nucleico del anticuerpo anti-CXCR4 variante, mutante o de la segunda generación es adecuado para utilizarse en la presente invención, el segmento de ácido nucleico se ve ensayado para confirmar la expresión de un anticuerpo anti-CXCR4 de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el segmento de ácido nucleico variante, mutante o de la segunda generación también se ensayará para confirmar la hibridación bajo condiciones de hibridación estándar, más preferiblemente estrictas estándar. Las condiciones de hibridación adecuadas ilustrativas incluyen la hibridación de aproximadamente 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), aproximadamente 0.5 M de NaPO_4 , aproximadamente 1 mM de EDTA a aproximadamente 50°C; y lavado con aproximadamente 1% SDS a aproximadamente 42°C.

Como una variedad de anticuerpos puede fácilmente prepararse, los métodos de tratamiento de la invención pueden ejecutarse proporcionando al animal o al paciente por lo menos un primer segmento de ácido nucleico o molécula que expresa una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-CXCR4, de la invención en el paciente. El "segmento o molécula de ácido nucleico que expresa un anticuerpo anti-CXCR4" generalmente estará en la forma de por lo menos un constructor o vector de expresión, y puede estar en la forma de un constructor o vector de expresión comprendido dentro de un virus o con una célula hospedera recombinante. Los vectores de terapia génica preferidos

de la presente invención generalmente serán vectores virales, tales como los comprendidos dentro de un retrovirus recombinante, el virus de herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés), adenovirus, el virus asociado con adeno (AAV, por sus siglas en inglés), citomegalovirus (CMV), y similar.

Un aspecto más proporciona un constructo de expresión o vector de expresión que comprende uno o más de los segmentos del ácido nucleico o moléculas de la invención. Preferiblemente, los constructos o vectores de expresión son recombinantes. Preferiblemente, los constructos o vectores además comprenden las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia proteica codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

Aún otro aspecto proporciona una célula hospedera o virus que comprende uno o más constructos de expresión o vectores de expresión de la invención. También se proporcionan células hospederas o virus que comprenden una o más de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Una célula hospedera o virus que expresa un anticuerpo de la invención forma un aspecto más.

Un aspecto más de la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende un paso de cultivar las células hospederas de la invención. Los métodos preferidos comprenden los pasos (i) cultivar una célula hospedera que comprende uno o más de los vectores de expresión recombinantes o una o más de las secuencias de ácido nucleico de la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o proteína codificada; y opcionalmente (ii) aislar u obtener el anticuerpo o proteína de la células hospedera o sobre el medio de cultivo/sobrenadante. Tales métodos de producción también pueden comprender un paso de purificación del anticuerpo o producto proteico y/o la formulación del anticuerpo o producto de una composición que incluye por lo menos un componente adicional, tal como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En modalidades cuando el anticuerpo o la proteína de la invención se forman de más de una cadena de polipéptido (por ejemplo, ciertos fragmentos tales como los fragmentos Fab), entonces todos los polipéptidos preferiblemente se expresan en la célula hospedera, ya sea del mismo o un diferente vector de expresión, de tal forma que las proteínas completas, por ejemplo, las proteínas de unión de la invención, pueden ensamblarse en la célula hospedera y pueden aislarse o purificarse ahí mismo.

Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse para producir anticuerpos adicionales que se unen a CXCR4. Tales usos involucran por ejemplo la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácido de un anticuerpo progenitor para formar un nuevo anticuerpo, en donde el anticuerpo progenitor es uno de los anticuerpos de la invención como se define en cualquier lugar en la presente, y se ensaya el nuevo anticuerpo resultante para identificar anticuerpos que se unen a CXCR4 y tienen una o más de las propiedades funcionales preferidas descritas en la presente. Tales métodos pueden utilizarse para formar nuevos anticuerpos que todos pueden ensayarse por su habilidad para unirse a CXCR4 y otras propiedades funcionales. Preferiblemente, la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos toma lugar en uno o más de los dominios CDR.

Tal modificación o la mutación a un anticuerpo progenitor puede llevarse a cabo en cualquier forma apropiada utilizando técnicas bien conocidas y documentadas en la técnica, por ejemplo, llevando a cabo métodos de mutagénesis aleatoria o dirigida. Si la mutagénesis dirigida se va a utilizar entonces una estrategia para identificar los residuos apropiados para la mutagénesis utiliza la resolución de la estructura de cristal del complejo de proteína-antígeno de unión, por ejemplo, el complejo Ab-Ag, para identificar los residuos clave involucrados en la unión del antígeno (Davies and Cohen, 1996). Posteriormente, esos residuos pueden mutarse para mejorar la interacción. Alternativamente, uno o más residuos de aminoácido puede simplemente activarse para mutagénesis directa y el efecto de la unión a CXCR4 se evalúa.

La mutagénesis aleatoria puede llevarse a cabo en cualquier forma apropiada, por ejemplo, a través de PCR propensa al error, intercambia de cadena o cepas *E. coli* de mutador.

De esta forma, uno o más de los dominios V_H de la invención puede combinarse con un solo dominio V_L o un repertorio de dominios V_L a partir de cualquier fuente apropiada y los nuevos anticuerpos resultantes ensayarse para identificar anticuerpos específicos para CXCR4. Esto es preferido. Inversamente, uno o más de los dominios V_L de la invención puede combinarse con un solo dominio V_H o repertorio de dominios V_H a partir de cualquier fuente apropiada y nuevos anticuerpos resultantes ensayarse para identificar anticuerpos que se a CXCR4.

Similarmente, una o más o preferiblemente las tres CDR de los dominios V_H y/o V_L de la invención pueden injertarse en un solo dominio V_H y/o V_L

o un repertorio de dominio V_H y/o V_L , según sea apropiado, y los nuevos anticuerpos resultantes ensayarse para identificar anticuerpos que se unen a CXCR4.

Las mutaciones activadas de la CDR, especialmente CDR3 de las cadenas ligera y/o pesada, han demostrado que son una técnica efectiva para aumentar la afinidad del anticuerpo y son preferidas. Preferiblemente, los bloques de tres a cuatro aminoácidos de la CDR3 o las regiones específicas denominadas “puntos calientes” se activan para la mutagénesis.

“Los puntos de acceso” son las secuencias en donde toma lugar la hipermutación somática *in vivo* (y más adelante Neuberger y Milstein, 1995). Las secuencias de punto de acceso pueden definirse como secuencias de nucleótido de consenso en ciertos codones. La secuencia de consenso es el tetranucleótido, RGYW, en donde R puede ser ya sea A o G, Y puede ser C o T y W puede ya sea A o T (Neuberger and Milstein, 1995). Además, los residuos de serina codificados por los nucleótidos AGY están predominantemente presentes en las regiones CDR del dominio variable sobre aquellas codificadas por TCN correspondientes a las secuencias de puntos de acceso potenciales (Wagner y otros, 1995).

De esta forma, la secuencia de nucleótidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo de la invención puede escanearse para la presencia de secuencias de puntos de acceso y codones AGY. Los puntos de acceso identificados de las regiones CDR de la cadena ligera y pesada después pueden opcionalmente compararse por las secuencias germinales de las cadenas pesada y ligera utilizando la base de datos International ImMunoGen Tics (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies y otros, 1990). Una secuencia, idéntica a la línea germinal, sugiere que la mutación somática no ha ocurrido; por consiguiente las mutaciones aleatorias pueden introducirse imitando los eventos somáticos que ocurren *in vivo* o alternativamente, la mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo, por ejemplo, en los puntos de acceso y/o codones AGY. En contraste, una secuencia diferente muestra que algunas mutaciones somáticas ya han ocurrido. Sin embargo quedará determinar si la mutación somática *in vivo* fue óptima.

Los puntos de acceso preferidos para la mutación son aquellos que codifican aminoácidos expuestos y preferiblemente aquellos que codifican aminoácidos que forman parte de los sitios de unión a antígeno. Otros puntos de acceso preferidos para la mutación son aquellos que codifican aminoácidos no conservados. Los puntos de acceso que codifican aminoácidos sepultados o

conservados dentro de la CDR preferiblemente no están mutagenizados. Estos residuos son usualmente críticos para la estructura general y probablemente no interactúan con el antígeno ya que están sepultados.

Los métodos para llevar a cabo la manipulación antes descrita de aminoácidos y dominios de proteína son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, las manipulaciones podrían convenientemente llevarse a cabo a través de ingeniería genética al nivel del ácido nucleico en donde las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión apropiadas y sus dominios se modifican de tal forma que la secuencia de aminoácido de la proteína expresada resultante a su vez se modifica en la forma apropiada.

El ensayo de la habilidad de uno o más anticuerpos para específicamente unirse a CXCR4 pueden llevarse a cabo a través de cualquier método apropiado que es bien conocido y se describe en la técnica. Las líneas de célula CXCR4+ pueden obtenerse de colecciones de cultivo, o pueden prepararse a través de la transformación de células negativas CXCR4 con un constructor que permite la expresión de CXCR4 recombinante. Tales células pueden fácilmente utilizarse para ensayar la unión, por ejemplo, a través de métodos convencionales tales ELISA, BIACore, FACS, etc.

Los nuevos anticuerpos a través de estos métodos preferiblemente tendrán propiedades funcionales mejoradas, por ejemplo una mayor o mejora afinidad (o por lo menos una afinidad equivalente) para CXCR4 como los anticuerpos progenitores, y también tratarse y utilizarse en la misma forma que los anticuerpos de la invención como se describen en cualquier lugar en la presente (por ejemplo, para terapia, diagnóstico, en composiciones, etc.). Alternativa o adicionalmente, los nuevos anticuerpos tendrán una o más de las propiedades funcionales mejoradas como se describe en cualquier lugar en la presente.

Los nuevos anticuerpos producidos, obtenidos o que se pueden obtener a través de estos métodos forman otro aspecto de la invención.

La invención además proporciona composiciones que comprenden por lo menos un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, opcionalmente incluyendo un diluyente. Tales composiciones pueden ser composiciones farmacéuticamente aceptables o composiciones para utilizarse en estudios de laboratorio. En términos de composiciones farmacéuticas, pueden preferiblemente formularse para administración parenteral, intravenosa o aún subcutánea.

La presente invención proporciona un número de métodos y usos de

los anticuerpos humanos y los fragmentos de anticuerpo de la invención. Con referencia a todos los métodos, los términos “un” y “uno” se utilizan para significar “por lo menos uno”, “por lo menos un primero”, “uno o más”, o “una pluralidad” de pasos en los métodos descritos, excepto cuando se especifique lo contrario. Esto es particularmente relevante para los pasos de administración en los métodos de tratamiento. De esta forma, no solamente pueden utilizarse diferentes dosis con la presente invención, sino diferentes números de dosis, por ejemplo, pueden utilizarse inyecciones, de hasta e incluyendo múltiples inyecciones. Los terapéuticos combinados pueden utilizarse, administrarse antes, después o durante la administración del anticuerpo terapéutico anti-CXCR4.

Varios métodos *in vitro* útiles y usos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son provistos que tienen implicaciones biológicas importantes. Primero se proporcionan métodos de, y usos, en la unión de CXCR4, que generalmente comprenden poner efectivamente en contacto una composición que comprende CXCR4 con por lo menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o uno de sus fragmentos de unión antígeno. Los anticuerpos de la invención, o sus inmunoconjugados, de esta forma pueden utilizarse en ensayos de unión. Los ensayos de unión adecuadamente útiles incluyen aquellos comúnmente utilizados en la técnica, tales como inmunoblots, Western blots, dot blots, RIA, ELISA, inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación, cromatografía por afinidad, y similar.

Los métodos de, y los usos en, la detección CXCR4 son provisto, que generalmente comprenden poner en contacto una composición que se sospecha que contiene CXCR4 con por lo menos un primer anticuerpo o inmunoconjugado de la invención, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de los complejos CXCR4/anticuerpo y detectar los complejos así formados. Los métodos de detección y los usos pueden utilizarse en conexión con muestras biológicas, por ejemplo en el diagnóstico de tumores, y kits de diagnóstico con base en los mismos también son provistos. También se cree que la detección de CXCR4 pueda ser un pronóstico para algunas enfermedades y de esta la mención del diagnóstico en la presente también incluye pronóstico, cuando es relevante. En particular, CXCR4 ha sido indicado para tener un valor de pronóstico para la recurrencia de la metástasis y la supervivencia, glioma y algunos cánceres en la infancia.

Los anticuerpos o las proteínas de unión de la invención pueden utilizarse para detectar CXCR4 *in vivo* o *in vitro*, en particular para detectar células CXCR4+. Por ejemplo, como CXCR4 se sobre-expresa en ciertas células tumorales, los anticuerpos o las proteínas de unión de la invención pueden utilizarse para determinar células tumorales *in vivo* o *in vitro*. Además, la habilidad de los anticuerpos para localizar las células CXCR4+ significa que los anticuerpos de la invención pueden activar sitios corporales en donde las células CXCR4+ están presentes, con lo cual el anticuerpo puede actuar en el sitio objetivo. En particular, la habilidad de los anticuerpos para localizar células tumorales CXCR4+ significa que los anticuerpos de la invención pueden activar sitios corporales en donde las células tumorales CXCR4+ están presentes, por lo que el anticuerpo debe actuar en el sitio objetivo.

Los métodos y usos de la presente invención están particularmente previstos para utilizarse en animales y pacientes que tienen, o está en riesgo de desarrollar, cualquier enfermedad o afección asociada con la expresión de CXCR4 o actividad o en donde CXCR4 juega un papel biológico. Tales enfermedades y trastornos incluyen enfermedades que están mediadas por células positivas CXCR4 típicamente células T CXCR4+ T inmunoreguladoras, las cuales, después de la unión de un ligando a CXCR4, pueden formar tomar parte en la trayectoria de señalización que causará o contribuirá a un trastorno o enfermedad. Estas también incluyen enfermedades causadas por proliferación aberrante de células que expresan CXCR4. Tales células de proliferación aberrante pueden naturalmente ser CXCR4+, o pueden haber sido mutadas/transformadas para expresar CXCR4. Como se mencionó anteriormente, la expresión de CXCR4 puede ayudar a las células cancerígenas a metastatizarse a lo largo de un gradiente SDF-1. También se incluyen las enfermedades caracterizadas por la sobre-expresión de CXCR4 en células que son inherentemente CXCR4+. Además, las cepas tóxicas CXCR4 de VIH utilizan CXCR4 para entrar en las células hospederas, de esta forma bloqueando que el receptor pueda habilitar la diseminación de esta enfermedad.

De esta forma, se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por CXCR4 y/o caracterizado por la proliferación aberrante de células positivas CXCR4, y/o caracterizado por la sobre-expresión de CXCR4 en células que son inherentemente CXCR4+.

Visto alternativamente, se proporciona el tratamiento de una afección que puede beneficiarse de uno o más de los siguientes:

(i) Inhibición de la unión de CXCR4 a su ligando.

(ii) Inhibición de las respuestas celulares mediadas por CXCR4 a un ligando CXCR4, particularmente la inhibición de la quimiotaxis o la migración, por ejemplo, en conexión con la metástasis de cáncer/invasión de órgano o respuesta inflamatoria, o una concentración de ión de calcio intracelular aumentada (activación celular).

(iii) Eliminación selectiva de células CXCR4+.

(iv) Activación e inducción de la migración de las células madre hematopoyéticas CXCR4+, como aquellas células se mantienen inactivas en la médula espinal a través de la interacción con su receptor CXCR4 con SDF-1 producido en la estroma de la médula espinal.

(v) Bloquear la infección de células CXCR4+ a través de las cepas X4 de VIH, que utilizan CXCR4 como el co-receptor durante la infección.

Preferiblemente, el ligando CXCR4 es SDF-1.

Es bien conocido por el experto en la técnica que, CXCR4 está involucrado en un amplio intervalo de enfermedades y trastornos, una terapia anti-CXCR4 dada, una vez mostró ser efectiva en cualquier sistema de modelo aceptable, que puede utilizarse para tratar el intervalo completo de enfermedades y trastornos conectados por la expresión de CXCR4.

En una modalidad, la afección mediada por CXCR4 es cáncer, y, en particularmente, la diseminación, formación de metástasis, invención de órgano y/o el crecimiento de tumor mediado o soportado por CXCR4 y la interacción con sus ligandos.

CXCR4 se expresó en una variedad de tumores, y ahora existe documentación significativa para la noción de que esta expresión juega un papel decisivo en la patofisiología del cáncer particularmente en la metástasis del cáncer. Varias líneas de la evidencia han conducido a la ahora grandemente aceptable idea de que la expresión de CXCR4 permite que las célula malignas utilicen gradientes con base en SDF-1 para la migración metastática. CXCR4 es por mucho el receptor de quimiocina más comúnmente expresado en células cancerígenas. La expresión se ha encontrado en casi todos los tumores estudiados. También es de interés que SDF-1 (CXCL12) se expresa a particularmente altos niveles en el hígado, pulmón, médula espinal, nodos linfoides y (en de alguna forma niveles inferiores) en el cerebro, es decir, sitios en los cuales los cánceres típicamente se metastatizan, o que están invadidos por tumores hematológicos. Existe una evidencia copiosa de que el bloqueo de la

señalización de CXCR4 causado por SDF-1 es capaz de reducir o prevenir la formación de metástasis en modelos de ratón. Esta inhibición de señalización puede lograrse a través de los anticuerpos (Muller y otros, 2001 y muchos otros), ARNsi para CXCR4 (Liang y otros, 2007), y péptidos (Kim y otros, 2008).

El bloqueo de CXCR4 también se describe como teniendo un efecto sobre la angiogénesis, por ejemplo, un efecto inhibitor (efecto anti-angiogénico). De esta forma, en una modalidad más los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para efectuar la angiogénesis (por ejemplo, tener un efecto anti-angiogénico). En aún otra modalidad, el anticuerpo antagónico de la invención puede utilizarse junto con cualquier agente anti-angiogénico descrito en la técnica. En particular, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en combinación con bevacizumab (Avastina) para el tratamiento de cáncer, o como segunda línea de tratamiento para pacientes en donde el tumor ha adquirido resistencia a Avastina.

Un estudio de Xu y otros, 2009 demostró que CXCR4 en células tumorales se regula de forma ascendente a través del tratamiento con Avastina. Esto hará a las células de tumor más susceptibles al tratamiento con anticuerpos que activan CXCR4. Esto es de especial interés para pacientes que han hecho resistentes al tratamiento con Avastina. Alternativamente, los dos fármacos pueden darse juntos.

Además, muchos de los compuestos que bloquean la señalización de CXCR4 que se describen como teniendo un efecto anti-metastático también se sabe que inhiben el crecimiento tumoral. Aunque el efecto exacto para limitar el crecimiento del tumor a través del bloqueo del receptor CXCR4 no está completamente entendido, existe una evidencia en aumento de que la interacción entre las células neoplásicas y el estroma es circundante es de importancia central. Un estudio ha demostrado que, aunque la transfección de las células pancreáticas y de cáncer de colon con ARNsi contra CXCR4 conducen a un poco efecto sobre el crecimiento celular *in vitro*, el crecimiento *in vivo* de los tumores derivados de estas células se suprimió significativamente (Guleng y otros, 2005). Además, se ha demostrado que los fibroblastos asociados con el carcinoma, con los aspectos del miofibroblasto, estimulado en el crecimiento de células de carcinoma de pecho mixtas marcadamente más que los fibroblastos mamarios normales del mismo paciente, y promovieron la angiogénesis mediante el reclutamiento de células progenitoras endoteliales (Orimo y otros, 2005). Estos efectos se mediaron a través de SDF-1 secretado por el fibroblasto/miofibroblasto

de tumor. El anticuerpo contra SDF-1 o ARNsi contra CXCR4 inhibieron el crecimiento del tumor. De esta forma, tomados juntos estos estudios demostraron que el micro-entorno del tumor es de importancia para el comportamiento del cáncer, y se obtuvo una marcada inhibición del crecimiento tumoral activando la interacción SDF-1/CXCR4 *in vivo*. De esta forma, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inhibir la atracción de células CXCR4+ en la estroma del tumor, y/o inhibir la activación de tales células para crear un micro-entorno favorable para el tumor.

En otra modalidad, la afección mediada por CXCR4 que es tratada es la presencia de células transformadas que expresan CXCR4.

Como ya se describió, CXCR4 fuertemente se expresa en muchos tumores. Esto puede utilizarse para aniquilar aquellas células por medio de la inducción de apoptosis, ADCC o CDC. Por supuesto, como CXCR4 también se expresa en una amplia variedad de células sanas, los aspectos de seguridad y los efectos secundarios son una razón de preocupación. El número limitado de estudios de la fase I disponibles en antagonistas de molécula pequeña para CXCR4 demostraron algunos efectos secundarios, en su mayor parte de menor preocupación. Sin embargo, no existen datos disponibles en uso a largo plazo de los fármacos que se activan CXCR4. Además, podría haber alguna variación dependiendo del fármaco utilizado; los anticuerpos de tipo MDX-1338, que inducen apoptosis podrían tener un muy diferentes perfil de seguridad de los anticuerpos que no lo tienen. Además, se demostró recientemente que el fármaco derivado del péptido CTCE-9908 causó la muerte de células cancerígenas de ovario a través de la inducción de la multinucleación, la detención de G₂-M y la mitosis anormal (catástrofe mitótica (Kwong y otros, 2009). Se puede especular que este modelo de acción, por ejemplo, catástrofe mitótica, es mucho más eficiente en células de tumor CXCR4+ que son propensas a la división celular, comparado con células neurales CXCR4+ completamente diferenciadas, que raramente si es que sucede experimentan la mitosis. De esta forma, en algunas modalidades, la aniquilación de las células de células CXCR4+ es un modo adicional de acción para los anticuerpos de la invención, aunque tal aniquilación preferiblemente se induce a través de un mecanismo diferente de la apoptosis.

En otra modalidad, la afección mediada por CXCR4 que se trató es la migración de las células de soporte de la médula espinal al sitio de tumor.

Un ensayo clínico de la fase II en carcinoma hepatocelular investigó el uso de CTCE-9908 (una señalización de CXCR4 de bloqueo de péptido

dimerizado) en combinación con quimioembolización transarterial siendo iniciada. La hipótesis es que CTCE-9908 bloquearía el reclutamiento de las células de soporte derivadas de médula espinal a través de un tumor después del procedimiento de quimioembolización transarterial además de bloquear el proceso metastático.

En otra modalidad, la afección mediada por CXCR4 a ser tratada es la migración de células CXCR4+ al sitio de inflamación.

CXCR4 se sabe que juega un papel en inflamación. Al igual que otras citocinas SDF-1 contribuye a la inflamación atrayendo las células CXCR4+ del sistema inmunitario al sitio de inflamación. El bloqueo de la interacción podría ser benéfico para una amplia variedad de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, por ejemplo, artritis reumatoide. El candidato de fármaco de molécula pequeña AMD3465, un antagonista CXCR4, ha demostrado que anula la respuesta inflamatoria mediada Th2 en un modelo provocado por el antígeno esquistosomal de formación de granuloma pulmonar (Hu y otros, 2006)

En aún otra modalidad, la afección mediada por CXCR4 a ser tratada es una infección viral, en particular una infección retroviral tal como la infección VIH, o cualquier otra infección viral en donde el virus se utiliza CXCR4 como un receptor.

Una porción significativa de la cepa de VIH utiliza CXCR4 como un co-receptor durante la infección (cepas VIH X4). El bloqueo del receptor CXCR4 ha demostrado que es muy efectivo en el bloqueo de la infección. AMD3100 ha demostrado que inhibe la entrada de las cepas VIH X4 en las cepas CXCR4 con una muy alta eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* en ensayos clínicos en humanos. Un derivado de este compuesto con biodisponibilidad aumentada, AMD070, está actualmente en ensayos clínicos de la fase II para el tratamiento de VIH. Varios otros antagonistas de CXCR4 están varias etapas de desarrollo para este propósito.

En aún otra modalidad, la sección mediada por CXCR4 a ser tratada es una afección en la que se desea movilizar las células madre detenidas en la médula espinal. La movilización de las células madre puede lograrse bloqueando la interacción CXCR4/SDF-1 y esto permite por ejemplo la restauración del sistema inmunitario, requerido, por ejemplo, después de irradiación de cuerpo completo o trasplante de médula espinal o un cáncer de sangre tal como el linfoma no Hodgkins o un mieloma múltiple. Tales métodos son útiles para tratar estas afecciones y cualquier otra enfermedad que refiera o podría beneficiarse de

trasplantes de células madre formadoras de sangre.

En enero del 2009, Genzyme recibió una aprobación de la FDA para vender un inhibidor CXCR4 de molécula pequeña plerixafor (anteriormente AMD3100) bajo el nombre comercial de Mozobil™ como un fármaco inyectable para pacientes con linfoma no de Hodgkins y mieloma múltiple, por la necesidad de trasplantes de células madre formadoras de sangre. Este producto pretende utilizarse para la movilización de células madre autólogas en combinación con G-CSF. El bloqueo de interacción entre CXCR4 y SDF-1 ha demostrado que aumenta tanto el conteo de glóbulos blancos como el número de células CD34+ en la sangre periférica significativamente, como SDF-1 es secretado por el estroma de la médula espinal que es en este caso contribuyendo a mantener la células madre en la médula espinal en una forma activada. Existen varios otros antagonistas CXCR4 bajo desarrollo para esta indicación.

En aún otra modalidad, el bloqueo de la señalización mediada por el receptor CXCR4 sensibiliza las células de tumor para el tratamiento con otros compuestos terapéuticos, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos. De esta forma, las terapias de combinación con fármacos quimioterapéuticos son particularmente preferidas. Tales modalidades son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres sanguíneos.

En diciembre del 2009, Genzyme anunció que el ensayo de la fase I/II humano proveyó datos clínicos tempranos sugiriendo que Mozobil® (inyección de plerixafor) en combinación con la quimioterapia pueden ofrecer un impacto terapéutico en células leucémicas protegidas en la médula espinal. En el ensayo clínico, Mozobil se dio como una estrategia de pre-acondicionamiento antes de la quimioterapia (régimen MEC: mitoxantrona, etoposida, y citarabina) a pacientes con leucemia mieloide aguda reincidente o refractaria (AML, por sus siglas en inglés). Muchos de los participantes en el ensayo fueron ya sea no sensibles a, o tuvieron cortas remisiones, después de los tratamientos. De los pacientes disponibles para la primera evaluación de seguimiento, los investigadores observaron una completa remisión (CR o CRi) en 50% de los pacientes. Los ensayos similares se han iniciado para otros cánceres sanguíneos.

Las modalidades descritas anteriormente pueden utilizarse para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades.

Los ejemplos de tipo de tumor en donde se ha demostrado la expresión de CXCR4 aumentada son cáncer de pecho, cáncer de próstata, cáncer colorectal, cáncer pancreático, melanomas malignos o metastáticos, cánceres de

cabeza y cuello incluyendo pero no limitándose a carcinomas de células escamosa oral y cáncer nasofaríngeo, cáncer del esófago, tumores de cerebro incluyendo, pero no limitándose a gliomas y meningiomas, leucemias, linfomas tales linfoma no de Hodgkins, neuroblastoma y otros cánceres infantiles, cáncer renal, hemangioblastomas, enfermedad de von Hippel-Lindau, tumores de pulmón (ambos SCLC y NSCLC), cánceres de hígado, cánceres ováricos, cánceres cervicales, carcinomas de tiroides papila, y osteosarcomas. El tratamiento de cáncer metastático o la inhibición de la invención celular cancerígena es particularmente preferida.

La enfermedad o trastorno mediado por CXCR4 también puede ser una enfermedad o afección asociada con enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Las enfermedades o afecciones preferidas incluyen:

(1) enfermedades alérgicas tales como anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), alergias a picaduras de insectos y alergias a alimentos, (2) enfermedades inflamatorias del intestino, tal como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, ileitis y enteritis, (3) vaginitis, (4) psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria y pruritos, (5) vasculitis, (6) espondiloartropatías, (7) escleroderma, (8) asma y enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma alérgica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades de pulmón hipersensible y similares, (9) enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis (incluyendo reumatoide y psoriática), esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, diabetes de tipo I, glomerulonefritis, y similares, (10) rechazo al injerto (incluyendo rechazo a aloinjerto y enfermedad de injerto contra hospedero), y (11) otras enfermedades en donde las respuestas inflamatorias indeseadas se van a iniciar, tal como la aterosclerosis, miositis, enfermedades neurodegenerativas medidas por célula T, esclerosis múltiple, encefalitis, meningitis, hepatitis, nefritis, asepsia, sarcoidosis, conjuntivitis alérgica, otitis, enfermedad de Castleman, sinusitis, choque endotóxico inducido por el LPS, síndrome de Behcet y gota. La artritis reumatoide y la inflamación mediada por Th2 son enfermedades particularmente preferidas a ser tratadas con los anticuerpos de la invención.

Como se utiliza en la presente, el término “proliferación aberrante” significa la proliferación celular que se desvía del curso normal, apropiado o esperado. Por ejemplo, la proliferación celular aberrante puede incluir la proliferación inapropiada de células cuyo ADN u otros componentes celulares se

han convertido en dañadas o defectuosas.

La proliferación celular aberrante puede incluir proliferación celular cuyas características están asociadas por una indicación causada por, mediada por, o que resulta en niveles inapropiadamente altos en la dirección celular, niveles inapropiadamente bajos de la apoptosis, o ambos. Tales indicaciones pueden caracterizarse, por ejemplo, por proliferaciones anormales individuales o locales múltiples de células, grupos de células, o tejido(s), cancerígenas o no cancerígenas, benignas o malignas.

Cualquier referencia a "tumor(s)" en la presente también se refiere "cáncer(s)" o "carcinoma(s)". Los cánceres metastáticos también pueden ser tratados, como puede ser la reducción de las metástasis de un tumor primario. La así denominada enfermedad residual mínima (MRD), que queda en pacientes después de la cirugía, puede ser manejable para inmunoterapia con anticuerpos anti-CXCR4.

La presente invención de esta forma además proporciona métodos de, y usos en, el tratamiento de una enfermedad como se define anteriormente, que comprende administrar a un animal o paciente con tal enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o un fragmento de unión antígeno o un inmunoconjugado de tal anticuerpo anti-CXCR4.

Un aspecto más de la invención proporciona el uso de los anticuerpos de la invención o un fragmento de unión antígeno o un inmunoconjugado de tal anticuerpo en la fabricación de una composición de un medicamento para utilizarse en terapia, formación de imágenes o diagnóstico.

Un aspecto más proporciona los anticuerpos de la invención o un fragmento de unión a antígeno o un inmunoconjugado para tal anticuerpo para utilizarse en terapia, diagnóstico o formación de imágenes.

Además, la invención proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención o un fragmento de unión antígeno o un inmunoconjugado de tal anticuerpo con uno o más excipientes, portadores, diluyentes, reguladores de pH o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

Los métodos *in vivo* como se describen en la presente generalmente se llevan a cabo en un mamífero. Cualquier mamífero puede ser tratado, por ejemplo, humanos y cualquier animal de ganado, doméstico o laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, puercos, gatos, perros, ovejas, conejos, cabras y monos. Preferiblemente, sin embargo, el mamífero es un

humano.

De esta forma, el término “animal” o “paciente” como se utiliza en la presente incluye cualquier mamífero, por ejemplo, humanos y cualquier ganado, animal doméstico o de laboratorio. Los ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, puercos, gatos, perros, ovejas, conejos, vacas y monos. Preferiblemente, sin embargo, el animal o paciente es un sujeto humano.

Esta invención enlaza ambos métodos de tratamiento de trastornos como se define anteriormente utilizando anticuerpos no conjugados o desnudos y sus fragmentos, y célula CXCR4+ (preferiblemente célula de tumor CXCR4+ o células CXCR4+ del sistema inmunitario, por ejemplo células que pueden ser infectadas por cepas trópicas CXCR4 de VIH), métodos que se activan utilizando inmunoconjugados en donde un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, está operativamente acoplado a un agente terapéutico de diagnóstico. A menos que se afirme específicamente lo contrario o se haga claro en términos científicos, los términos “anticuerpo y sus fragmentos” como se utiliza en la presente, por consiguiente significa un anticuerpo o fragmento “no conjugado o desnudo”, que no se une a otro agente, particularmente un agente terapéutico o de diagnóstico. Estas definiciones no excluyen modificaciones del anticuerpo tales como, a manera de ejemplo, solamente modificaciones para mejorar la vida media biológica, la afinidad, la avidéz u otras propiedades del anticuerpo, o combinaciones del anticuerpo con otros efectores.

Los métodos de tratamiento y usos de la invención también abarcan el uso de ambos anticuerpos no conjugados o desnudos e inmunoconjugados. En los métodos de tratamiento a base de inmunoconjugados, un anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, preferiblemente está operativamente acoplado a un segundo agente terapéutico (el anticuerpo anti-CXCR4 mismo siendo el primer agente terapéutico).

Un agente terapéutico apropiado puede seleccionarse dependiendo de la enfermedad o afección a ser tratada y/o el modo deseado de la acción terapéutica.

Por ejemplo, cuando el modo deseado de acción es antagónico, por ejemplo, para modular la señalización celular de la célula CXCR4+ objetivo, por ejemplo, para modular la señalización dentro de la célula objetivo o para modular la señalización de la célula objetivo a otras células, o para regular de manera descendente o inhibir la función/señalización de las células CXCR4+, por ejemplo,

células de tumor, o células del sistema inmunitario involucradas en una respuesta inflamatoria o autoinmunitaria, o células que son susceptibles a infecciones virales tales como VIH, entonces los agentes apropiados podrían ser agentes inmunomodularmente terapéuticos tales como agentes antiinflamatorios, por ejemplo, corticoesteroides (preferiblemente glucocorticoides) o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, por sus siglas en inglés) tales como los inhibidores COX-2, sulfonanilidas, licofelona y ácidos grasos omega-3, antagonistas esteroideos, antagonistas de citocina o quimiocina, o inhibidores de la expresión de citocina o quimiocina. Los ejemplos alternativos podrían ser inhibidores de la angiogénesis tales como angiostatina, endostatina, cualquiera de las angiopoyetinas, vasculostatina, canstatina o maspina. Los ejemplos alternativos podrían ser inhibidores de la trayectoria de señalización adicionales tales como el inhibidor de un receptor de factor de crecimiento, por ejemplo, receptores IGF EGFR tales como el receptor de IGF-1 (IGF-1R), IGF-2R, la proteína de unión IGF (IGFBP-3) y FGFR.

Cuando la inhibición del crecimiento de las células CXCR4+ es un modo deseado de acción (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer) entonces un agente apropiado con efectos inhibidores del crecimiento pueden seleccionarse, por ejemplo un agente terapéutico citostático tales como los inhibidores de los receptores de esteroideos (por ejemplo, el receptor de estrógeno).

Cuando la aniquilación de la célula es un modo de acción deseado, entonces un agente citotóxico apropiado tales como los agentes radioterapéuticos o inhibidores ATPase pueden seleccionarse.

Para el tratamiento cáncer los fármacos anticancerígenos apropiados también podrían utilizarse.

Alternativamente, en aplicaciones anti-víricas, por ejemplo el tratamiento de VIH, un agente anti-vírico apropiado puede utilizarse como el terapéutico adicional.

Es importante observar que múltiples modos de acción podrían ser apropiados para ciertas enfermedades o etapas de enfermedad, y, si es así, múltiples terapéuticos adicionales pueden utilizarse. También es importante observar que muchos agentes tienen efectos múltiples, o efectos que difieren dependiendo del contexto. El bloqueo de las trayectorias de señalización puede tener un efecto tanto en la migración de las células tumorales así como el crecimiento de los tumores. Muchos agentes quimioterapéuticos también tienen más de una función. Las quimiocinas y sus antagonistas pueden tener diferentes

efectos en conexión con el cáncer comparado con aplicaciones antiinflamatorias. Sin embargo, estaría bien dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar un agente terapéutico adicional apropiado dependiendo de la enfermedad, la etapa de la enfermedad y el modo de acción deseado.

Los terapéuticos adicionales pueden ser provistos en la forma de un inmunoconjugado pero pueden alternativamente ser provistos en una terapia de combinación, por ejemplo, cuando varios agentes se administran juntos (por ejemplo, como una mezcla), de manera separada o secuencialmente, si esto es más apropiado.

Los métodos de tratamiento anteriores y los usos generalmente involucran la administración de que una composición farmacéuticamente efectiva al animal o paciente sistémicamente, tal como a través de inyección transdérmica, intramuscular, intravenosa y similar. Sin embargo, cualquier ruta de administración que permita que el agente localice el sitio de tumor u otros sitios apropiados, tales como los sitios de inflamación o infección viral serán aceptables. Por lo tanto, otras rutas adecuadas para el suministro incluyen oral, nasal o respiratoria y tópica.

“Administración”, como se utiliza en la presente, significa la provisión o suministro de terapéuticos en de anticuerpo anti-CXCR4 en una cantidad(s) y durante un periodo de tiempo(s) efectivo para ejercer los efectos terapéuticos, por ejemplo, anti-tumorales, antiinflamatorios, o anti-víricos. La administración pasiva de terapéuticos proteicos generalmente es preferida, en parte, por su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el término “administración” en la presente se utiliza para referirse a cualquiera y todos los medios a través de los cuales los anticuerpos anti-CXCR4 de la invención se suministran o por el contrario son provistos al sitio objetivo. “Administración” por consiguientes incluye la provisión de células que producen el anticuerpo anti-CXCR4 de la invención en una forma efectiva para resultar en el suministro al sitio objetivo. En tales modalidades, puede ser deseable formular o empacar las células en una membrana selectivamente permeable, estructura o dispositivo implantable, generalmente uno que pueda removerse para cesar la terapia. El anticuerpo anti-CXCR4 exógeno de la invención aún generalmente será preferido, como representa un método no invasivo que permite monitorear cercanamente la dosis y controlarla.

Los métodos terapéuticos y usos de la invención también pueden extenderse a la provisión de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención en una forma efectiva para dar como resultado su

expresión en la vecindad del tumor o su localización en el sitio objetivo. Cualquier técnica de terapia génica puede utilizarse tal como suministro de ADN desnudo, genes recombinantes y vectores, suministro a base de células, incluyendo la manipulación *ex vivo* de las células del paciente y similares.

Los anticuerpos anti-CXCR4 de la invención también pueden utilizarse para suministrar otros agentes terapéuticos o de diagnósticos al sitio objetivo. En tales modalidades, los otros agentes terapéuticos o de diagnóstico generalmente están operativamente acoplados a los anticuerpos anti-CXCR4 de la invención.

Las “cantidades terapéuticamente efectivas” para utilizarse en la invención son cantidades del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o sus inmunoconjugados, efectivos para inhibir la unión de un ligando CXCR4 a CXCR4; para inhibir las respuestas celulares mediadas por CXCR4 a un ligando CXCR4, preferiblemente para inhibir la liberación de los iones de calcio en respuesta a un ligando CXCR4 o para inhibir la migración de células CXCR4+; para reducir la inflamación; para inhibir la formación de metástasis; para inhibir la invasión celular cancerígena; para inhibir el crecimiento del tumor; para inhibir la angiogénesis del tumor; para inducir la regresión o remisión del tumor después de la administración a animales o pacientes que tienen un tumor CXCR4+; para limitar la diseminación de las cepas VIH trópicas CXCR4 y/o cuando el mecanismo de acción involucra la aniquilación de la célula, para específicamente aniquilar por lo menos una porción de las células CXCR4+. Tales efectos preferiblemente se logran mientras se exhibe poca o ninguna unión a, o poca o ninguna aniquilación de las células en tejidos sanos, normales y ejerciendo efectos secundarios adversos insignificantes o manejables en tejidos sanos, normales del animal o paciente.

Por “sitio objetivo” significa la ubicación de las células CXCR4+ que median un trastorno o que proliferan en una forma aberrante causando o exacerbando un trastorno. El sitio objetivo puede de esta forma por ejemplo ser un tumor o el sitio de la inflamación mediada por CXCR4. “Células objetivo” son células CXCR4+ que median un trastorno o que proliferan en una forma aberrante causando o exacerbando un trastorno. De esta forma, las células objetivo pueden, por ejemplo, incluir células de tumor CXCR4+, células del sistema inmunitario, por ejemplo, leucocitos CXCR4+ (para aplicaciones antiinflamatorias/anti-inmunitarias) o células inmunitarias CXCR4+ activadas por cepas VIH trópicas CXCR4.

Los términos “preferencialmente” y “específicamente”, como se utilizan en la presente en el contexto de la aniquilación de células CXCR4+ tale

como las células de tumor CXCR4+, leucocitos CXCR4+ (para aplicaciones antiinflamatorias/anti-autoinmunitarias) o de reducir la inflamación o de inducir la regresión o remisión del tumor, de esta forma significa que el anticuerpo anti-CXCR4 de la invención o sus inmunoconjugados, funcionan para obtener la destrucción de la célula objetivo CXCR4+, por ejemplo, la destrucción de la célula tumoral, que está sustancialmente confinada en el sitio objetivo, y sustancialmente no se extiende para causar la destrucción en tejidos sanos, normales del animal o sujeto.

Los anticuerpos anti-CXCR4 de la invención o los conjugados terapéuticos preferiblemente se enlazan a uno o más agentes radioterapéuticos, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes que inducen apoptosis, fármacos anti-tubulina, agentes anti-celulares o citotóxicos, antagonistas de citocina o quimiocina, inhibidores de la expresión de citocina o quimiocina, inhibidores ATPase, agentes antiinflamatorios, otros anticuerpos (por ejemplo, como anticuerpos biespecíficos) o coagulantes (factores de coagulación), o agentes antiinflamatorios tales como corticoesteroides, preferiblemente glucocorticoesteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

La invención de esta forma proporciona un intervalo de anticuerpos conjugados y fragmentos de los mismos en donde el anticuerpo anti-CXCR4 está operativamente acoplado a por lo menos otro agente terapéutico o de diagnóstico. El término "inmunconjugado" se utiliza ampliamente para definir la asociación operativa del anticuerpo con otro agente efectivo y no pretende referirse solamente a cualquier tipo de asociación operativa, y está particularmente no limitado a "conjugación" química. Las proteínas de fusión recombinantes se contempla particularmente. Mientras como el suministro o activación del agente sea capaz de unirse al objetivo, y al agente terapéutico o de diagnóstico es suficientemente funcional después del suministro, el modo de acoplamiento será adecuado.

El acoplamiento de los agentes a través de fracciones de carbohidrato en anticuerpos también se contempla. La glicosilación, tanto O-enlazada como N-enlazada, naturalmente ocurre en anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden modificarse para recrear o crear sitios de glicosilación adicionales si se desea, que simplemente se logra modificando las secuencias de aminoácido apropiadas (tales como Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser, o Thr en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) en la secuencia primaria del anticuerpo.

Los agentes actualmente preferidos para utilizarse en el anticuerpo

anti-CXCR4 o conjugados terapéuticos de la invención y métodos relacionados y usos son aquellos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo y/o los seleccionados para un tipo particular de enfermedad (por ejemplo, tipo de tumor) o paciente.

“Agentes terapéuticos que complementan o mejoran los efectos del anticuerpo” incluye agentes radioterapéuticos, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, agentes inductores de apoptosis, fármacos anti-tubulina, agentes anti-celulares o citotóxicos, coagulantes, antagonistas de citocina o quimiocina, inhibidores de la expresión de citocina o quimiocina, inhibidores ATPase, agentes antiinflamatorios tales como corticoesteroides, preferiblemente glucocorticoides, o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), otros anticuerpos, (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), cualquiera o más de los cuales es preferido para utilizarse en la presente.

Los agentes anticancerígenos preferidos, particularmente anti-leucemia incluyen fármacos de antraciclina tales como daunorubicina, Doxorubicina, Citarabina, 6-tioguanina, Mitoxantrona, busulfano (Myleran®), dasatinib (Sprycel™), prednisona, sulfato de vincristina (Oncovin®), Clorambucilo, Fludarabina, Pentostatina y Cladribina.

Los ejemplos anti-angiogénicos actualmente preferidos incluyen angiostatina, endostatina, cualquiera de las angiopoyetinas, vasculostatina, canstatina y maspina.

Los “fármacos anti-tubulina”, como se utiliza en la presente, significa cualquier agente, fármaco, profármaco o combinación de estos que inhibe la mitosis celular, preferiblemente bajo la inhibición directa o indirecta de las actividades de tubulina necesarias para la mitosis celular, preferiblemente la polimerización o despolimerización de tubulina. Los fármacos anti-tubulina actualmente preferidos incluyen colchicina, taxol, vinblastina, vincristina, vindescina y una o más de las combretastatina.

Los NSAID actualmente preferidos incluyen inhibidores COX-2, sulfonanilidas, licofelona y ácidos grasos omega-3.

El acoplamiento o asociación de los agentes preferidos con anticuerpos anti-CXCR4 de la invención da los “inmunoconjugados”, en donde tales inmunoconjugados por lo general tienen propiedades terapéuticas mejoradas y aún sinérgicas, por ejemplo, propiedades anti-tumor o antiinflamatorias.

El uso de agentes anti-celulares y citotóxicos (cuando es apropiado) da como resultado las “inmunotoxinas” del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención,

mientras el uso de factores de coagulación da como resultado "coaguligandos" del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención.

El uso de por lo menos dos agentes terapéuticos también se contempla, tales como las combinaciones de uno o más de los agentes anteriores.

En ciertas aplicaciones, los terapéuticos del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención estarán operativamente enlazadas a agentes citotóxicos, citostáticos o por el contrario anti-celulares que tienen la habilidad de aniquilar o suprimir el crecimiento o la división celular de las células. Los agentes anti-celulares adecuados incluyen agentes quimioterapéuticos, así como citotoxinas y agentes citostáticos. Los agentes citostáticos generalmente son aquellos que alteran el ciclo natural de la célula de una célula objetivo, preferiblemente de tal forma que la célula se retira del ciclo celular.

Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen: hormonas, tales como esteroides; anti-metabolitos, tales como citosina arabinosida, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; antraciclinas; mitomicina C; alcaloides vinca; antibióticos; demecolcina; etoposida; mitramicina; y agentes de alquilación anti-tumorales, tales como clorambucilo o melfalano. Ciertos agentes anti-celulares preferidos son los inhibidores de la síntesis de ADN, tales como daunorubicina, doxorubicina/adriamicina, y similares. En general, taxol/paclitaxel, docetaxel, cisplatina, gemcitabina, una combretastatina y doxorubicina/adriamicina son agentes anticancerígenos actualmente preferidos.

Los inhibidores ATPase de tipo V también son actualmente preferidos, tales como salicililalamida, concanamicina o bafilomicina, como potentes inhibidores de la síntesis, tales como psimberina, pederina, irciniastatina A.

En ciertas aplicaciones terapéuticas, las fracciones de toxina serán preferidas, debido a su mucha mayor habilidad de la mayor parte de las toxinas para distribuir un efecto aniquilador de la célula, cuando se compara con otros agentes potenciales. Por consiguiente, ciertos agentes anti-celulares preferidos para constructos de anticuerpo anti-CXCR4 de la invención son toxinas derivadas de plantas, derivadas de hongos o de bacterias. Las toxinas ilustrativas incluyen epipodofilotoxinas; endotoxina bacteriana o la fracción de lípido A de la endotoxina bacteriana; proteínas que inactivan ribosoma, tales como saporina o gelonina; a-sarcina; aspergilina; restrictocina; ribonucleasas, tales como ribonucleasa placentar; la toxina de difteria y la exotoxinas de *pseudomonas*. Los ejemplos actualmente preferidos son ricina, gelonina, abrina, las toxinas de difteria,

pseudomonas y tosferina.

Ciertas toxinas preferidas son las toxinas de cadena A, tales como la cadena de ricina A. La fracción de toxina más preferida es por lo general la cadena de ricina A que ha sido tratada para modificar o remover residuos de carbohidrato, la denominada "cadena A desglicosilada" (dgA). La cadena de ricina A desglicosilada es preferida debido a su potencia extrema, su vida media más larga, y porque es económicamente factible para fabricar en un grado clínico y a escala. La cadena de ricina A recombinante y/o truncada también puede utilizarse.

Los terapéuticos del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención pueden comprender un componente que es capaz de promover la coagulación, es decir, un coagulante. Aquí, la activación del anticuerpo puede ser directa o indirectamente, por ejemplo, a través de otro anticuerpo, enlazado a un factor que directa o indirectamente estimula la coagulación.

Los factores de coagulación preferidos para tales usos son el Factor Tisular (TF, por sus siglas en inglés) y los derivados TF, tales como TF truncado (Ttf, por sus siglas en inglés), TF dimérico, trimérico, polimérico/multimérico, y TF mutante deficiente en la habilidad de activar el Factor VII. Otros factores de coagulación adecuados incluyen los coagulantes dependientes de la vitamina K, tales como el Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa y Factor X/Xa; los factores de coagulación dependientes de la vitamina K que carecen de modificación Gla; el activador del Factor X del veneno de víbora de Russell; compuestos activadores de plaqueta, tales como tromboxano A₂ y tromboxano A₂ sintasa; e inhibidores de fibrinólisis, tales como α 2-antiplasmina. En general, el Factor Tisular truncado (tTF) es actualmente preferido.

La preparación de inmunoconjugados e inmunotoxinas es generalmente bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de E. U. A. No. 4,340,535). Cada una de las siguientes patentes además se incorpora en la presente por referencia para los propósitos de aún adicionalmente suplementar las enseñanzas de la presente con respecto a la generación, purificación y uso de inmunotoxinas: Patente de E. U. A. No. 6,004,554; 5,855,866; 5,965,132; 5,776,427; 5,863,538; 5,660,827 y 6,051,230.

Una variedad de agentes quimioterapéuticos y otros farmacológicos también pueden exitosamente conjugarse con los terapéuticos del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención. Los agentes antineoplásicos ilustrativos que han sido conjugados con anticuerpos incluyen doxorubicina, daunomicina, metotrexato y

vinblastina. Además, el acoplamiento de otros agentes tales como neocarzinostatina, macromicina, trenimona y α -amanitina han sido descrito (ver Patentes de E. U. A. Nos. 5,660,827; 5,855,866; y 5,965,132; cada una de las cuales se incorpora en la presente).

Las preparaciones de coaguligandos también se practican fácilmente. La asociación operable de uno o más factores de coagulación con un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención puede ser un enlace directo, tales como aquellos descritos anteriormente para las inmunotoxinas. Alternativamente, la asociación operativa puede ser un acoplamiento indirecto, tal como en donde el anticuerpo está operablemente enlazado a una segunda región de unión, preferiblemente un antígeno o a una región de unión a antígeno de un anticuerpo, que se une al factor de coagulación. El factor de coagulación deberá acoplarse al anticuerpo anti-CXCR4 de la invención en un sitio diferente de su sitio de coagulación funcional, particularmente en donde se utiliza un enlace covalente para unir las moléculas.

Los anticuerpos biespecíficos o triespecíficos también pueden utilizarse en los métodos de la invención. En tales anticuerpos un brazo se une a CXCR4 y es un anticuerpo de la presente invención. Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos y descritos en la técnica.

En la preparación de inmunoconjugados, inmunotoxinas y coaguligandos, se puede utilizar la expresión recombinante. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-CXCR4 seleccionado de la invención, y el agente terapéutico, toxina o coagulante, se acoplan en-marco en un vector de expresión. La expresión recombinante de esta forma da como resultado la producción del ácido nucleico para producir el inmunoconjugado deseado. Los enlazadores cruzados químicos, y los puentes de avidina:biotina también pueden unirse a los agentes terapéuticos para el anticuerpo anti-CXCR4 de la invención.

Las composiciones y métodos de la presente invención pueden utilizarse en combinación con otros terapéuticos y diagnósticos. En términos de agentes biológicos, preferiblemente agentes de diagnóstico o terapéuticos, para utilizarse "en combinación" con un anticuerpo anti-CXCR4 de acuerdo con la presente invención, el término "en combinación" se utiliza sucintamente para cubrir un intervalo de modalidades. La terminología "en combinación", a menos que específicamente se dicte lo contrario o se haga claro a partir de la terminología científica, de esta forma se aplica a varios formatos de composiciones

combinadas, farmacéuticas, cocteles, kits, métodos y primeros y segundos usos médicos.

Las modalidades “combinadas” de la invención de esta forma incluyen, por ejemplo, en donde el anti-CXCR4 de la invención es un anticuerpo desnudo y se utiliza en combinación con un agente o agente terapéutico que no está operativamente acoplado al mismo. En tales casos, el agente o agente terapéutico puede utilizarse en una forma no activada o activada. En “forma no activada”, el agente, particularmente los agentes terapéuticos, generalmente se utilizarán de acuerdo con su uso estándar en la técnica. En “forma activada”, el agente generalmente estará operativamente acoplado a un anticuerpo diferente o región de activación que suministra el agente o agente terapéutico al sitio de la enfermedad objetivo. El uso de tales formas activadas de agentes biológicos, tanto diagnósticos como terapéuticos, también es bastante estándar en la técnica.

En otras modalidades “combinadas” de la invención, el anticuerpo anti-CXCR4 de la invención es un inmunoconjugado en donde el anticuerpo por sí mismo está operativamente asociado o combinado con el agente o el agente terapéutico. El acoplamiento operativo incluye todas las formas de acoplamiento directo o indirecto como se describe en la presente y se conoce en la técnica.

Los usos “combinados”, particularmente en términos de un anticuerpo anti-CXCR4 de la invención en combinación con agentes terapéuticos, también incluye composiciones combinadas, farmacéuticos, cocteles, kits, métodos y primero y segundo usos médicos en donde el agente terapéutico está en la forma de un profármaco. En tales modalidades, el componente de activación capaz de convertir el profármaco en su forma funcional del fármaco puede de nuevo estar operativamente asociado con los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente invención.

En ciertas modalidades preferidas, las composiciones terapéuticas, las combinaciones, los farmacéuticos, los cocteles, los kits, métodos y primero y segundo usos médicos, serán las “combinaciones de profármaco”. Como se entenderá por los expertos en la técnica, el término “combinación de profármaco” a menos que se afirme lo contrario significa que el anticuerpo de la invención está operablemente acoplado a un componente capaz de convertir el profármaco en el fármaco activo, y no que el anticuerpo sea acople al profármaco mismo. Sin embargo, no hay requerimientos de que las modalidades del profármaco de la invención necesiten utilizarse como combinaciones de profármaco. Por consiguiente, los profármacos pueden utilizarse en cualquier forma en la que se

utilizan en la técnica, incluyendo en la forma ADEPT y otras formas.

De esta forma, cuando las composiciones combinadas, farmacéuticos, cocteles, kits, métodos y primero y segundo usos médicos se describen, preferiblemente en términos de agentes de diagnóstico, y más preferiblemente agentes terapéuticos, las combinaciones incluyen anticuerpos anti-CXCR4 que son anticuerpos desnudos e inmunoconjugados, y en donde la práctica de las modalidades *in vivo* de la invención involucra la administración anterior, simultánea o posterior de los anticuerpos desnudos o inmunoconjugados y el agente biológico, de diagnóstico o terapéutico; mientras como, en algunas formas conjugadas o no conjugadas, la provisión general de alguna forma del anticuerpo y alguna forma del agente biológico, de diagnóstico o terapéutico se obtiene.

Lo anterior y otras explicaciones de los efectos de la presente invención en tumores se hacen para simplicidad para explicar el modo combinado de operación, el tipo de agente(s) acoplado y similar. Este método descriptivo no deberá interpretarse ya sea como subestimando o una sobre-simplificación de las propiedades benéficas de los anticuerpos anti-CXCR4 de la invención. Por consiguiente se entenderá que tales anticuerpos por sí mismos tienen propiedades anti-CXCR4 y que los inmunoconjugados de tales anticuerpos mantendrán estas propiedades y las combinarán con las propiedades del agente acoplado; y además, que el efecto combinado del anticuerpo y cualquier agente acoplado típicamente será mejorado y/o magnificado.

La invención por consiguiente proporciona composiciones, composiciones farmacéuticas, kits terapéuticos y cocteles medicinales que comprenden, opcionalmente en por lo menos una primera composición o en base, una cantidad biológicamente efectiva de al menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o un fragmento de unión a antígeno o un inmunoconjugado de tal anticuerpo anti-CXCR4; y una cantidad biológicamente efectiva de al menos un segundo agente biológico, componente o sistema.

El "por lo menos un segundo agente, componente o sistema biológico" por lo general será un agente terapéutico o de diagnóstico, componente o sistema, pero no necesita serlo. Por ejemplo, el al menos un segundo agente, componente o sistema biológico, puede comprender componentes para la modificación del anticuerpo y/o para unir estos agentes al anticuerpo. Ciertos segundos agentes, componentes o sistemas biológicos preferidos por profármacos o compuestos para hacer y utilizar profármacos, incluyendo componentes para

hacer el profármaco mismo y componentes para abarcar los anticuerpos de la invención para funcionar en tal profármaco o modalidades ADEPT.

Cuando se incluyen agentes terapéuticos o de diagnóstico como al menos un segundo agente, componente o sistema biológico, tales terapéuticos y/o diagnósticos típicamente serán aquellos para utilizarse en conexión con el tratamiento o diagnóstico de uno o más de los trastornos definidos anteriormente.

De esta forma, en ciertas modalidades "por lo menos un segundo agente terapéutico" se incluirá en el kit o coctel terapéutico. El término se selecciona con referencia al anticuerpo anti-CXCR4 de la invención que es el primer agente terapéutico. Los agentes terapéuticos que son apropiados para ser "por lo menos un segundo agente terapéutico" de acuerdo con la invención se explican anteriormente en conexión con los inmunoconjugados.

En términos de composiciones, kits y/o medicamentos de la invención, las cantidades efectivas combinadas de los agentes terapéuticos pueden estar comprendidas dentro de un solo envase o medios de envase, o estar comprendidas dentro de diferentes envases o medios de envase. Los cocteles generalmente se mezclarán juntos para uso combinado. Los agentes formulados para administración intravenosa por lo general serán preferidos. Los componentes formadores de imagen también pueden incluirse. Los kits también pueden comprender instrucciones para utilizar el al menos un primer anticuerpo y el uno o más de los otros agentes biológicos incluidos.

Generalmente hablando, el al menos un segundo agente terapéutico puede administrarse a un animal o paciente sustancialmente de forma simultánea con el anticuerpo anti-CXCR4 de la invención; tal como de una composición farmacéutica individual o de dos composiciones farmacéuticas administradas muy cercanamente.

Alternativamente, el al menos un segundo agente terapéutico puede administrarse al animal o paciente en un tiempo secuencial a la administración del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención. "En tiempo secuencial", como se utiliza en la presente, significa "alternado" de tal forma que al menos un segundo agente bio-cancerígeno se administra al animal o paciente en un tiempo diferente a la administración del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención. En general, los dos agentes se administran en tiempos efectivamente separados para permitir que los dos agentes ejerzan sus efectos terapéuticos respectivos, es decir, se administran en "intervalos de tiempo biológicamente efectivos". El al menos un segundo agente terapéutico puede administrarse a un animal o paciente en un tiempo

biológicamente efectivo después del anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o en un tiempo biológicamente efectivo posterior al del terapéutico.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de un animal o paciente con un tumor, que comprende:

(a) someter al animal o paciente a un primer tratamiento que sustancialmente reduce la carga del tumor; y

(b) posteriormente administrar por lo menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno; opcionalmente en donde el anticuerpo o el fragmento está operativamente asociado con un segundo agente terapéutico.

Los primeros tratamientos preferidos incluyen la resección quirúrgica y la intervención quimioterapéutica.

En otras modalidades, la presente invención proporciona métodos para tratar a un animal o paciente con trastorno mediado con CXCR4 que comprende:

(a) someter al animal o paciente a un primer tratamiento que sustancialmente reduce la carga mediada por CXCR4 tal como inflamación; y

(b) posteriormente administrar por lo menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno; opcionalmente en donde al anticuerpo o el fragmento está operativamente asociado con un segundo agente terapéutico.

En ciertas otras modalidades, los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención puede combinarse con uno o más agentes de diagnóstico, típicamente agentes de diagnóstico para utilizarse en conexión con el diagnóstico de un trastorno como se define anteriormente. Un intervalo de composiciones, kits y métodos de diagnóstico de esta forma se incluye dentro de la invención.

Los aspectos adicionales son métodos de diagnóstico o formación de imágenes de un sujeto que comprende la administración de una cantidad apropiada de un anticuerpo u otra proteína de la invención como se define en la presente al sujeto y detectar la presencia y/o cantidad y/o la ubicación del anticuerpo u otra proteína de la invención en el sujeto.

En una modalidad, la invención proporciona un método para reducir la inmunosupresión, asociada con la expresión de CXCR4 en un animal, que comprende administrar al animal el anticuerpo de la invención, o uno de sus inmunoconjugados, en una cantidad efectiva para formar complejos entre el anticuerpo y el CXCR4 en el animal, por lo tanto reduciendo la inmunosupresión

asociada con la expresión de CXCR4 en un animal.

Las enfermedades apropiadas a ser formadas en imágenes o diagnosticadas de acuerdo con los usos antes descritos y los métodos incluyen cualquier enfermedad asociada con CXCR4 como se describe en cualquier lugar en la presente y preferiblemente cualquier cáncer como se describe en cualquier lugar en la presente.

En una modalidad, la invención proporciona un método para el diagnóstico de enfermedades en un animal que comprende el paso de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba tomada del animal con un anticuerpo de la invención o uno de sus inmunoconjugados.

En una modalidad más, la invención proporciona un método para el diagnóstico de enfermedades en un animal que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto una muestra de prueba tomada del animal con un anticuerpo de la invención o uno de sus inmunoconjugados;

(b) medir o detectar la presencia y/o cantidad y/o ubicación del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba; y opcionalmente

(c) comparar la presencia y/o cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba para un control.

En los métodos anteriores, el paso de contacto se lleva a cabo bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno. Las condiciones apropiadas pueden fácilmente determinarse por un experto en la técnica.

En los métodos anteriores cualquier muestra de prueba apropiada puede utilizarse, por ejemplo células de biopsia, tejidos u órganos que se sospecha que están afectados por la enfermedad o secciones histológicas.

En ciertos de los métodos anteriores, la presencia de cualquier cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba sería indicativa de la presencia de la enfermedad. Preferiblemente, para hacerse un diagnóstico positivo, la cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba es mayor que, preferiblemente significativamente mayor que, la cantidad encontrada en una muestra de control apropiada. Más preferiblemente, los niveles significativamente más altos son estadísticamente significativos, preferiblemente con un valor de probabilidad de <0.05 . Los métodos apropiados para determinar la significancia estadística son bien conocidos y están documentados en la técnica y cualquiera de estos puede utilizarse.

Las muestras de control apropiadas pueden fácilmente seleccionarse

a través de un experto en la técnica, por ejemplo, en el caso del diagnóstico de una enfermedad particular, un control apropiado podría ser una muestra de un sujeto que no tiene esa enfermedad. Los "valores" de control apropiados podrían fácilmente determinarse sin correr una "muestra" de control en cada prueba, por ejemplo por la referencia de intervalo de sujetos normales conocidas en la técnica.

Para utilizarse en aplicaciones de diagnóstico o formadoras de imágenes, los anticuerpos de la invención pueden marcarse con un marcador detectable tal como un radio-opaco, o radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; un emisor radioactivo (por ejemplo, emisores α , β o γ); un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tales como fluoresceína isotiocianato, rodamina o luciferina; un enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente formador de imágenes, o un ión metálico; una fracción química tal como biotina que puede detectarse a través de la unión a una fracción detectable de un cognado específico, por ejemplo, avidina/estreptavidina marcada. Los métodos para acoplar una etiqueta a una proteína de unión, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Tales marcadores detectables permiten la presencia, cantidad o ubicación de los complejos de proteína-antígeno de unión en la muestra de prueba a ser examinada.

Los marcadores detectables preferidos para uso *in vivo* incluyen un compuesto detectable con rayos X, tal como bismuto (III), oro (III), lantano (III) o plomo (II); un ión radioactivo, tal como cobre⁶⁷, galio⁶⁷, galio⁶⁸, indio¹¹¹, indio¹¹³, yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹³¹, mercurio¹⁹⁷, mercurio²⁰³, renio¹⁸⁶, renio¹⁸⁸, rubidio⁹⁷, rubidio¹⁰³, tecnecio^{99m} o itrio⁹⁰; un isótopo de resonancia giratoria magnético nuclear, tal como cobalto (II), cobre (II), cromo (III), disprosio (III), erbio (III), gadolinio (III), holmio (III), hierro (II), hierro (III), manganeso (II), neodimio (III), níquel (II), samario (III), terbio (III), vanadio (II) o iterbio (III); o rodamina o fluoresceína.

La invención también incluye agentes de diagnóstico formadores de imagen que comprenden los anticuerpos de la invención acoplados en la etiqueta que produce una señal detectable directa o indirectamente. Las etiquetas apropiadas se describen en cualquier lugar en la presente.

La invención además incluye kits que comprenden uno o más de los anticuerpos, inmunoconjugados o composiciones de la invención o una o más de las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención, o

uno o más vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención, o una o más células hospederas o virus que comprenden los vectores de expresión recombinantes o secuencias de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente los kits son para utilizarse en los métodos y usos como se describen en la presente, por ejemplo, métodos terapéuticos de diagnóstico o formadores de imágenes como se describe en la presente, o para utilizarse en ensayos o métodos *in vitro* como se describe en la presente. El anticuerpo en tales kits puede preferiblemente ser un conjugado de anticuerpo como se describe en cualquier lugar en la presente, por ejemplo, puede conjugarse con una fracción detectable o puede ser un inmunoconjugado. Preferiblemente tales kits comprenden instrucciones para utilizar los componentes del kit, por ejemplo en diagnósticos. Preferiblemente, los kits son para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades como se describe en cualquier lugar en la presente y opcionalmente comprende instrucciones para utilizar los componentes del kit para diagnosticar o tratar tales enfermedades.

Los anticuerpos de la invención como se definen en la presente también pueden utilizarse como herramientas moleculares para aplicaciones y ensayo *in vitro* o *in vivo*. Como los anticuerpos tienen un sitio de unión a antígeno, estos pueden funcionar como miembros de pares de unión específicos y estas moléculas pueden utilizarse en cualquier ensayo en donde el miembro del par de unión particular es requerido.

De esta forma, en aún aspectos adicionales de la invención se proporciona un reactivo que comprende un anticuerpo de la invención como se define en la presente y el uso de tales anticuerpos como herramientas moleculares, por ejemplo, en ensayos *in vitro* o *in vivo*.

El tratamiento del cáncer también puede llevarse a cabo a través de:

(a) formando una imagen de un tumor a través de la administración a un animal o paciente con un tumor de una cantidad de diagnóstico de por lo menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 detectablemente marcado de la invención, que comprende un agente de diagnóstico operablemente acoplado al anticuerpo anti-CXCR4 de la invención, por lo tanto formando una imagen detectable del tumor; y

(b) posteriormente administrar al mismo animal o paciente una cantidad terapéuticamente optimizada de por lo menos un primer anticuerpo anti-CXCR4 desnudo de la invención o un constructo de agente-anticuerpo terapéutico utilizando tal anticuerpo, por lo tanto causando un efecto anti-tumoral.

La invención ahora se describirá con mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a las Tablas y Figuras en donde:

La Tabla 1 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al anticuerpo C-9P21

La Tabla 2 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al anticuerpo B-1M22

La Tabla 3 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al anticuerpo C-1I24

La Tabla 4 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al anticuerpo D-1K21

La Tabla 5 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al anticuerpo 9N10

La Tabla 6 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al IgG del anticuerpo C-9P21. Las regiones variables están subrayadas.

La Tabla 7 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al IgG del anticuerpo B-1M22. Las regiones variables están subrayadas.

La Tabla 8 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al IgG del anticuerpo C-1I24. Las regiones variables están subrayadas.

La Tabla 9 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al IgG del anticuerpo D-1K21. Las regiones variables están subrayadas.

La Tabla 10 enumera algunas de las secuencias descritas en la presente con relación al IgG del anticuerpo 9N10. Las regiones variables están subrayadas.

La Tabla 11 enumera otras secuencias descritas en la presente con relación a los anticuerpos de la invención.

La **Figura 1** muestra la secuencia de nucleótido y aminoácido de *inter alia* la cadena pesada y ligera del clon C-9P21. ScFv se clonó a través del sitio NcoI/NotI en pHOG21. Los sitios de restricción utilizados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en *itálicas* y subrayados. La secuencia enlazadora entre VH y VL está en *itálicas*. El epítipo c-myc y 6 His están subrayados y subrayados dobles, respectivamente.

La **Figura 2** muestra la secuencia de nucleótido y aminoácido de

inter alia la cadena pesada y ligera del clon B-1M22. ScFv se clonó a través del sitio NcoI/NotI en pHOG21. Los sitios de restricción utilizados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en *itálicas* y subrayados. La secuencia enlazadora entre VH y VL está en *itálicas*. El epítipo c-myc y 6 His están subrayados y subrayados dobles, respectivamente.

La **Figura 3** muestra la secuencia de nucleótido y aminoácido de inter alia la cadena pesada y ligera del clon C-1I24. ScFv se clonó a través del sitio NcoI/NotI en pHOG21. Los sitios de restricción utilizados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en *itálicas* y subrayados. La secuencia enlazadora entre VH y VL está en *itálicas*. El epítipo c-myc y 6 His están subrayados y subrayados dobles, respectivamente.

La **Figura 4** muestra la secuencia de nucleótido y aminoácido de inter alia la cadena pesada y ligera del clon D-1K21. ScFv se clonó a través del sitio NcoI/NotI en pHOG21. Los sitios de restricción utilizados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en *itálicas* y subrayados. La secuencia enlazadora entre VH y VL está en *itálicas*. El epítipo c-myc y 6 His están subrayados y subrayados dobles, respectivamente.

La **Figura 5** muestra la secuencia de nucleótido y aminoácido de inter alia la cadena pesada y ligera del clon 9N10. ScFv se clonó a través del sitio NcoI/NotI en pHOG21. Los sitios de restricción utilizados para la clonación inicial (NcoI, HindIII, MluI y NotI) están en *itálicas* y subrayados. La secuencia enlazadora entre VH y VL está en *itálicas*. El epítipo c-myc y 6 His están subrayados y subrayados dobles, respectivamente.

La **Figura 6A** muestra la tinción EasyCyte que demuestra la unión de los clones scFv B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 a líneas de células HEK293 transfectadas contra no transfectadas con CXCR4. La **Figura 6B** muestra la tinción EasyCyte que demuestra la unión de los clones scFv B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 para líneas de células DT40 transfectadas contra no transfectadas. La **Figura 6C** muestra la tinción EasyCyte que demuestra la unión de los clones IgG C-9P21, 9N10, y F7 a líneas de células Ramos y CCRF-CEM.

La **Figura 7A** muestra la tinción EasyCyte de 10^5 células Jurkat con 0.5 μ g de cada uno de los clones scFv B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 sin y con competencia con el ligando y AMD-3100. La **Figura 7B** muestra la tinción EasyCyte de 10^5 células Ramos con 0.5 μ g con cada uno de los clones scFv B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 sin y con competencia con el ligando y AMD-3100. La **Figura 7C** muestra la tinción EasyCyte de 10^5 células CCRF-CEM con

0.1 μg cada uno de los clones IgG C-9P21, 9N10, y F7 con y sin competencia con el ligando 4 μg , 1 μg y 0.5 μg .

La **Figura 8A** muestra la tinción EasyCyte de 10^5 células CCRF-CEM con 0.5 μg de C-1I24 (línea punteada), B-1M22 (línea sólida oscura) y F7 (línea sólida pálida) comparado con PBS (sombreado negro). La **Figura 8B** muestra la tinción EasyCyte de 10^5 células CCRF-CEM con 0.5 μg de D-1K21 (línea punteada), C-9P21 (línea sólida oscura) y F7 (línea sólida pálida) comparado con PBS (sombreado negro). Todos los anticuerpos estuvieron en el formato IgG1 y la unión se detectó con anticuerpo secundario IgGrPE anti-humano de cabra.

La **Figura 9** muestra la unión de B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 a células HEK293T/17 temporalmente expresando CXCR4 de ratón o mono. Las columnas marcadas como "Fugeno" son células tratadas con agentes de transfección aplicado sin ADN. Esta columna sirve como control negativo.

La **Figura 10** muestra un experimento EasyCyte en donde los clones scFv B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 se titularon con células CCRF-CEM para determinar la concentración óptima para utilizarse en ensayos de flujo de Ca^{++} .

Las **Figuras 11A, 11B, 11C, 11D y 11E** muestran los resultados del ensayo de flujo Ca^{++} en células CCRF-CEM (marcado con Fluo-4). Los anticuerpos B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 se ensayaron en ambos al nivel scFv (Figura 11A) y el nivel IgG (Figura 11B, 11C y 11D), el clon 9N10 se ensayó al nivel IgG (Figura 11E). Las células se pre-incubaron con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de scFv (Figura 11A) o 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG (Figura 11B, 11C y 11D), o 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG (Figura 11E) durante 15 min antes de agregar el SDF-1 α ligando específico de CXCR4. El registro de la señal se inició aproximadamente 10 seg después de agregar el ligando. Las áreas bajo las curvas (AUC, por sus siglas en inglés) se integraron y graficaron como porcentajes de AUC para estimulación máxima con SDF-1 α .

Las **Figuras 12A y 12B** muestran los resultados del ensayo de flujo de Ca^{++} en células CCRF-CEM (marcado con Fluo-4). Los anticuerpos 9P21 y 9N10 se ensayaron al nivel IgG. Las células se pre-incubaron con concentraciones variables de los anticuerpos durante 15 minutos antes de agregar el ligando SDF-1 α específico de CXCR4. El registro de la señal se inició aproximadamente 10 seg después de agregar el ligando. La Figura 12A muestra la reducción de la señal a una serie de concentraciones. La Figura 12B muestra los datos originales.

La **Figura 13** muestra la inhibición de la migración celular inducida por el ligando (SDF-1 α) a través de anti-CXCR4 scFv C-9P21. Las células CCRF-

CEM de leucemia de célula T humanas marcadas con BATDA se indujeron para migrar en cámaras Boyden, en donde el ligando SDF-1 se colocó en la cámara inferior y las células se co-incubaron con anticuerpos o medios solamente como un control en la cámaras superiores. Las células que migraron a la cámara inferior se detectaron por intensidad de fluorescencia después de la lisis celular inducida por Tritón X-100. Los valores medios y SD por triplicaron.

Las **Figuras 14A, 14B y 14C** muestran la inducción de ADCC a través de los anticuerpos anti-CXCR4 B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21. La aniquilación de la dosis-respuesta de las células CCRF-CEM se muestra para scFv C-9P21 y D-1K21 (a), e IgG C-9P21 y D-1K21 (b), e IgG B-1M22 y C-1I24.

Las **Figuras 15A y 15B** muestran los resultados de ensayos para probar la habilidad de los anticuerpos B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 para inducir CDC. La dosis-respuesta de la aniquilación de las células Ramos en la presencia de suero humano se muestran para IgG B-1M22 y C-1I24 (Figura 15A). C-9P21 y D-1K21 no induce CDC (Figura 15B). Como control, el anticuerpo F7 en el formato IgG1 se utilizó.

La **Figura 16A** muestra un análisis de la actividad apoptótica de los anticuerpos anti-CXCR4 B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 con Anexina V. Como controles, el anticuerpo F7 y Estaurosporina (S; 25 nM) se utilizaron. El control negativo (nivel de fondo), no fue anticuerpo, y no se agregó estaurosporina como se muestra en la columna 0. Sombreado gris claro: Cantidad total de células muertas, positivo tanto para Anexina V como PI, sombreado gris oscuro: células apoptóticas como se define como siendo positivas para Anexina V pero negativas para PI. La **Figura 16B** muestra un análisis de la actividad apoptótica de los anticuerpos anti-CXCR4 C-9P21 y 9N10 con Anexina V. Como controles, se utilizó el anticuerpo F7. Sombreado gris claro: cantidad total de células muertas, positivas tanto para Anexina V como PI, sombreado gris oscuro: células apoptóticas como se define como siendo positivas para Anexina V pero negativas para PI.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Nuevos Anticuerpos

Se han identificado cinco anticuerpos humanos que pueden específicamente unirse a CXCR4. Las formas de cadena individual de los anticuerpos se clonaron en el plásmido pHOG21 (Kipriyanov y *otros*, 1997) que contiene los epítomos con etiqueta c-myc y 6xHis. La bacteria TG1 bacteria se transformó, y el scFv se expresó bajo inducción IPTG. La unión del scFv purificado

se confirmó por EasyCyte.

Las secuencias de nucleótido de la cadena pesada y ligera del anticuerpo que producen clones se secuenciaron. Los anticuerpos se designaron como C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de C-9P21 se muestran en la Figura 1. Las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada de C-9P21 se muestran en la Tabla 1. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de B-1M22 se muestran en la Figura 2. Las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada de B-1M22 se muestran en la Tabla 2. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de C-1I24 se muestran en la Figura 3. Las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada de C-1I24 se muestran en la Tabla 3. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de D-1K21 se muestran en la Figura 4. Las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada de D-1K21 se muestran en la Tabla 4. La secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de 9N10 se muestran en la Figura 5. Las regiones CDR de las cadenas ligera y pesada de 9N10 se muestran en la Tabla 5.

La forma IgG de los anticuerpos C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10 también se ha elaborado. La forma IgG es del isotipo IgG1 y comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada comprende un dominio V_H de SEC ID NO: 69 (para C-9P21), SEC ID NO: 71 (para B-1M22), SEC ID NO: 73 (para C-1I24), SEC ID NO: 75 (para D-1K21) o SEC ID NO: 69 (para 9N10) y una región constante IgG1 humana. Cada cadena ligera comprende un dominio V_L de SEC ID NO: 70 (para C-9P21), SEC ID NO: 72 (para B-1M22), SEC ID NO: 74 (para C-1I24), SEC ID NO: 76 (para D-1K21) o SEC ID NO: 103 (para 9N10) y una región constante de cadena ligera lambda humana (para B-1M22 y C1I24), o un región constante de cadena ligera kappa humana (para C-9P21, D-1K21 y 9N10). Las secuencias IgG completas de C-9P21, B-1M22, C-1I24, D-1K21 y 9N10 se muestran en la Tablas 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente.

Células y Cultivo Celular

Las líneas celulares CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda, número ATCC CCL-119), HEK293T/17 (riñón humano, número ATCC CRL-11268), Ramos (linfoma de Burkitt, ATCC CRL-1596), Jurkat 6E-1 (Leucemia de célula T humana, ATCC ECACC) y DT40 (linfoma de pollo, número ATCC CRL-2111) se obtuvieron de la Colección de Cultivo de Tipo Americano (ATCC,

Rockville, MD). Las células CCRF-CEM, Ramos, Jurkat y DT40 se mantuvieron en medio de cultivo, Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés). Todas las células se mantuvieron en suero de becerro fetal, la concentración fue de 10% para células DT40 y HEK293T y 20% para las células CCRF-CEM, Jurkat y Ramos. Todos los medios se complementaron con Penicilina y Estreptomicina.

Las células Ramos y Jurkat se dividieron tres veces por semana a 3×10^5 células/ml por 48 horas de cultivo y a 2×10^5 células/ml durante el fin de semana.

Las células CCRF-CEM se dividieron tres veces por semana a 3×10^5 células/ml por 48 horas de cultivo y a 2×10^5 células/ml durante el fin de semana.

Las células HEK293T/17 se dividieron de dos a tres veces por semana a 3.2×10^5 células/ml por 48 horas de cultivo y a 2.7×10^5 células/ml durante el fin de semana.

Para la transfección temporal, las células HEK293T/17 se sembraron como 2×10^6 células en un frasco T75 (Nunc). Después de 48 horas del sembrado, las células se transfectaron con Eugene (Roche). Se utilizaron 40 μ l de Eugene y 16 μ g de ADN por T75. Las células se utilizaron para los ensayos 48h después de la transfección.

Ejemplo 2: Especificidad de Unión de los Clones del Anticuerpo para Células que Expresan CXCR4

Los cuatro anticuerpos B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 se ensayaron al nivel de scFv para su especificidad a CXCR4 mediante su habilidad para unirse a células transfectadas con CXCR4. Las células transfectadas difieren de sus contrapartes sin transfectar solamente en la expresión de CXCR4.

Material y Métodos:

Las células DT40 y HEK293T/17 se mantuvieron como se describe anteriormente.

Las células DT40+CXCR4, HEK293+CXCR4, DT40 y HEK293 se cosecharon de frascos de cultivo, se lavaron dos veces con PBS (400 x g, 5 min, 4°C) y se volvieron a suspender en PBS conteniendo 0.2% de BSA y 0.09% de NaN_3 . Se alicuotaron 1×10^5 células por cavidad en placas de 965 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Las células se centrifugaron (400 x g, 5 min, 4°C) y se volvieron a suspender en 50 μ l de ScFvs (10 μ g/ml) en PBS conteniendo 0.2% de BSA y 0.09% de NaN_3 . Después de 1

hora de incubación (4°C), las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃ y tiñeron con un anticuerpo anti-cMyc de murino producido internamente (2.5 µg/ml). Después de 1 hora de incubación (4°C), las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃ y se incubaron por 30 minutos a 4°C con IgG anti-ratón de cabra conjugado con RPE (F0479, Dako, Dinamarca) diluido a 5 µg/ml en PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃. Las células se lavaron, se volvieron a suspender en 200 µl de PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃, y se transfirieron a una placa Costar de 96 cavidades en forma de U (Corning, Schiphol-Rijk, Países Bajos) para citometría de flujo utilizando un dispositivo Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

Los cuatro clones mostraron unión específica a las líneas de células transfectadas, con la excepción de B-1M22 en células HEK transformadas (ver Figuras 6A y 6B), (aunque el anticuerpo B-1M22 mostró unión específica a las células transfectadas DT40). Se debe notar que se sabe desde hace mucho que CXCR4 tiene una tendencia a desarrollar conformaciones un tanto diferentes dependiendo de la línea de células que las expresa (Baribaud y otros, 2001). Este hecho es probablemente la causa de diferentes resultados en las diferentes líneas de células. En estos experimentos, el clon C-9P21 fue generalmente el mejor aglutinante.

Además, como se describe más adelante, los clones 9N10, C-9P21 y F7 se ensayaron a nivel IgG para su habilidad para unirse a células que naturalmente expresan CXCR4 (Ramos, CCRF-CEM).

Material y Métodos:

Las células Ramos y CCRF-CEM se mantuvieron como se describe anteriormente.

Las células se cosecharon de frascos de cultivo, lavaron 2 veces con PBS (350 x g, 5 min, 4°C) y se volvieron a suspender en PBS conteniendo 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃. Se alicuotaron 1 x 10⁵ células por cavidad en placas de 96 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frikenhausen, Alemania). Las células se centrifugaron (350 x g, 5 min, 4°C) y se volvieron a suspender en 50 µl de IgG (50 µg/ml) en PBS conteniendo 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃. La titulación se hizo en doce puntos y dilución triple. Después de 1 hora de incubación (4°C), las células se lavaron tres veces con 150 µl de PBS con 0.2% de

BSA y 0.09% de NaN_3 y se incubaron por 30 minutos a 4°C con IgG anti-humano de cabra conjugado con RPE (AbD seroTec #204009) diluido a 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN_3 . Las células se lavaron, se volvieron a suspender en 200 μl de PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN_3 , y transfirieron a una placa Costar de 96 cavidades en forma de U (Corning, Schiphol-Rijk, Países Bajos) para citometría de flujo utilizando un dispositivo Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

En este experimento, los tres clones reconocieron las líneas celulares, en una forma dependiente de la dosis (ver Figura 6C). F7 parece que se une ligeramente mejor a ambas líneas de células cuando se compara con 9N10 y C-9P21.

Ejemplo 3: Interferencia de Anticuerpos Anti-CXCR4 con la Unión del Ligando

Los cuatro anticuerpos B-1M22, C-9P21, C-1I24, y D-1K21 se ensayaron a nivel scFv para su especificidad a CXCR4 mediante su habilidad para unirse a células transfectadas CXCR4 y a células de linfoblastoide con expresión constitutiva de CXCR4 en la presencia y ausencia de dos moléculas que específicamente se unen a CXCR4. Una molécula es SDF-1, el ligando natural para CXCR4, la otra es AMD3100, un inhibidor competitivo altamente específico derivado de un péptido para la unión de SDF-1 α a CXCR4.

Materiales y Métodos:

Las células Jurkat y Ramos se mantuvieron como se describe anteriormente.

Los clones scFv se expresaron a gran escala y se purificaron como fracción de monómero mediante fraccionamiento SEC. Las líneas de células que expresan CXCR4⁺ natural Jurkat y Ramos se cosecharon de frascos de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS complementado 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN_3 y alicuotaron a 1×10^5 células por cavidad en placas de 96 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Las células se granularon por centrifugación (400 g, 5 min) y después se incubaron por 60 min a 4°C con 1 μg de SDF-1 α (PeproTech EC, Londres, UK) y 50 μl de scFv diluido a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN_3 , ambos adicionados al mismo tiempo a las células. Una muestra sin ligado o 157 μg de AMD3100 sirvieron como control para la especificidad de

CXCR4 ya que AMD3100 solamente se une a este receptor. AMD3100 se agregó simultáneamente con el scFv a las células. Los sobrenadantes se aspiraron después de un paso de centrifugación a 400 g por 5 min y las células se lavaron otras dos veces con 100 µl de PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃ y los pasos de centrifugación (5 min a 400 g) antes de la incubación por 1 hr a 4°C con 50 µl de anti-cMyc producido internamente diluido a 2.5 µg/ml en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃. Después de lavado tres veces con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃, las células se tiñeron con IgG anti-ratón de Cabra conjugado con rPE (BD Biosciences) diluido a 5 µg/ml en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃ y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Las células se volvieron a lavar y se volvieron a suspender en 200 µl de PBS con 0.2% BSA y 0.09% NaN₃ y se transfirieron a una placa de 96 cavidades en forma de U (Corning) para citometría de flujo utilizando un dispositivo EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

Tres de los cuatro clones, B-1M22 siendo la excepción, mostraron unión específica a ambas líneas de células. Los tres clones de unión también se inhiben por medio de ambos SDF-1 y AMD3100 aunque los grados de competencia son variables (ver Figura 7A (células Jurkat) y Figura 7B (células Ramos). Esto sugiere que los clones se unen a grandes rasgos a los mismos sitios de unión que el ligando natural y pueden tener un efecto biológico. Para B-1M22, el nivel de unión es demasiado bajo para permitir testimonios de unión o competencia. Sin embargo, como se muestra en los siguientes ejemplos, B-1M22 es uno de los mejores aglutinantes descritos en la presente en la unión a CXCR4 en células CCRF-CEM (ver Ejemplos 4 y Figura 8A). De nuevo, se cree que la tendencia de CXCR4 a desarrollar en alguna forma diferentes conformaciones que dependen de la línea celular que la expresa, es la explicación detrás de los datos obtenidos con B-1M22. Se puede observar que C-9P21 y C1I24 muestran una excelente unión a todos los tipos de células ensayadas lo que sugiere que tiene la capacidad de unirse a CXCR4 en múltiples conformaciones que pueden ser muy ventajosas.

En un experimento más, como se describe más adelante, los tres anticuerpos 9N10, C-9P21 y F7 se ensayaron al nivel de IgG para su especificidad a CXCR4 mediante su habilidad para unirse a células CCRF-CEM que naturalmente expresan CXCR4 en la presencia y ausencia de SDF-1, una

molécula que específicamente se une a CXCR4.

Materiales y Métodos:

CCRF-CEM se mantuvieron como se describe anteriormente.

Las células de la línea celular CCRF-CEM que expresan CXCR4⁺ natural se cosecharon de frascos de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃ y alicuotaron a 1×10^5 células por cavidad en placas de 96 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Las células se granularon por centrifugación (350 g, 5 min) y después se incubaron por 60 min a 4°C con 4, 1, 0.5 µg de SDF-1α (PeproTech EC, Londres, UK) y 50 µl de IgG diluido a 2 µg/ml en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃, ambos agregados al mismo tiempo a las células. Las muestras sin ligando sirvieron como control. Los sobrenadantes se aspiraron después del paso de centrifugación a 350 g por 5 min y las células se lavaron otras dos veces con 150 µl de PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃ y los pasos de centrifugación (5 min a 350 g) antes de teñirse con IgG anti-humano de cabra conjugado con RPE (AbD seroTec #204009) diluido a 2.5 µg/ml en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃ y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Las células se volvieron a lavar y suspender en 200 µl de PBS con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃ y se transfirieron a una placa de 96 cavidades en forma de U (Corning) para citometría de flujo utilizando un dispositivo EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

Ambos clones, C-9P21 y 9N10 mostraron unión específica a la línea de células CCRF-CEM. Ambos clones también se inhibieron por SDF-1 (ver Figura 7C). Se debe notar que en este experimento, F7 muestra la mejor unión a las células según juzgado por la señal absoluta más alta.

Ejemplo 4: Conversión de los Candidatos de Anticuerpo en el Formato IgG

Para la comparación de la actividad biológica de los anticuerpos anti-CXCR4 identificados, se convirtieron B-1M22, C-1I24, C-9P21 y D-1K21 y 9N10 en el formato de anticuerpo IgG1 de longitud completa. Como un control, se generó el anticuerpo F7. El anticuerpo F7 se describe que se une a CXCR4 (ver WO2008/060367 de Medarex). La secuencia de las cadenas VH y VL del anticuerpo F7 son provistas en SEC ID NO: 25 y SEC ID NO: 29 de

WO2008/060367. Con el fin de producir este anticuerpo en un formato IgG1, una secuencia de nucleótido optimizada se dedujo de la secuencia de aminoácido para el anticuerpo F7 como se describe en la patente WO2008/060367 (VH: SEC ID NO: 25 y VL: SEC ID NO: 29). Esta secuencia después se sintetizó, se clonó en el formato IgG1/Kappa Humano como se describe por Norderhaug y otros (JIM 204:27-87, 1997), se expresó en células HEK293 células y posteriormente purificó por medio de Proteína A. Para confirmar que los IgG retuvieron su habilidad para unirse a células positivas CXCR4, todos los IgG se evaluaron en células CCRF-CEM que expresan naturalmente CXCR4.

Materiales y Métodos:

Los genes que codifican los dominios variables correspondientes se clonaron en el vector de expresión de mamífero pLNO que comprende los genes para los dominios constantes humanos (Norderhaug y otros, *supra*).

Los anticuerpos se expresaron en una fábrica de células, y la primera cosecha se purificó en una columna de proteína A y fraccionó en un monómero mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

La línea de células CCRF-CEM que expresa CXCR4⁺ natural se cosechó de frascos de cultivo, se lavó 2 veces con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃ y alicuotó a 1×10⁵ células por cavidad en placas de 96 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Las células se granularon por centrifugación (400 g, 5 min) y después se incubaron por 60 min a 4°C con 50 µl de IgG diluido a 10 µg/ml en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃. Los sobrenadantes se aspiraron después del paso de centrifugación a 400 g por 5 min y las células se lavaron otras dos veces con 100 µl de PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃, cada lavado fue seguido por un paso de centrifugación (5 min a 400 g). Después, las células se tiñeron por 30 minutos a 4°C con 50 µl de IgG anti-humano de Cabra conjugado con rPE (AbD Serotec) diluido a 5 µg/ml con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% NaN₃ y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y suspendieron de nuevo en 200 µl de PBS con 0.2% BSA y 0.09% NaN₃ y se transfirieron a una placa de 96 cavidades en forma de U (Corning) para citometría de flujo utilizando un dispositivo EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

Todos los clones ensayados retuvieron su capacidad para unirse a células positivas CXCR4 (ver Figura 8A para C-1124 y B-1M22 y Figura 8B para D-1K21 y C-9P21; los datos para 9N10 no se muestran). También se puede notar de las curvas de EasyCyte de la Figura 8 que en estos experimentos los clones descritos en la presente muestra una significativamente mejor unión a células CCRF-CEM que expresan CXCR4 que el anticuerpo F7 (valores medios 48.11 (F7), 179.03 (D-1K21), 626.43 (C-9P21), 910.58 (C-1124) y 1077.33 (B-1H22) comparado con 3.11 (control negativo con PBS).

Ejemplo 5: Reactividad Cruzada de las Especies

Los candidatos de anticuerpo se ensayaron a nivel scFv para su habilidad para reaccionar de forma cruzada con CXCR4 de mono y ratón.

Materiales y Métodos:

Las células HEK293T/17 se mantuvieron como se describe anteriormente.

Se realizaron análisis de unión FACS (EasyCyte) utilizando células HEK-293 temporalmente transfectadas con plásmidos que codifican CXCR4 ya sea de ratón (número de acceso a Gene bank BC031665) o de mono (*Macaca mulatta*) (número de Acceso NCBI NP_001036110). Se realizaron dos experimentos, uno utilizando el anticuerpo IgG anti-ratón de cabra marcado con α -cMyc y PE, el segundo utilizando un anticuerpo RPE-c-Myc directamente conjugado para la detección. Además, se analizó la reactividad cruzada a nivel IgG. En el último caso, se detectó la unión del anticuerpo con el anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado con PE.

Resultados:

D-1K21 mostró una buena reactividad cruzada en ambos CXCR4 de ratón y de mono. Las variantes scFv, B-1M22, C-9P21 y C-1124 también mostraron buena reactividad cruzada con el antígeno de mono pero de baja (B-1M22) a intermedia (C-1124, C-9P21) reactividad con CXCR4 de ratón. (Ver Figura 9). 9N10 también se ensayó, y mostró que tiene el mismo patrón de reactividad cruzada como C-9P21, con valores absolutos ligeramente superiores para la unión.

Ejemplo 6: Inhibición de la Señalización Inducida por Ligando a Través de CXCR4

Los anticuerpos anti-CXCR4, B-1M22, C-1124, C-9P21 y D-1K21 se ensayaron en ambos niveles scFv y IgG para su habilidad para influenciar el flujo Ca^{++} inducido por el ligando SDF-1 α . 9N10 solamente se ensayó al nivel IgG. El

experimento se realizó utilizando la línea de células CCRF-CEM positivas CXCR4⁺ natural.

En un primer paso se determinaron las concentraciones óptimas del anticuerpo por titulación de los anticuerpos en las células CCRF-CEM.

Materiales y Métodos:

Las células CCRF-CEM se mantuvieron como se describe anteriormente.

La línea de células CCRF-CEM que expresan CXCR4⁺ natural se cosechó de frascos de cultivo, se lavó dos veces con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃ y alicuotaron a 1×10^5 células por cavidad en placas de 96 cavidades en forma de V (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Las células se granularon por centrifugación (400 g, 5 min) y después se incubaron por 60 min a 4°C con 50 µl de IgG diluidos a una concentración inicial de 10 µg/ml y además se titularon a diluciones dobles 11 veces en PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de regulador de pH de NaN₃. Los sobrenadantes se aspiraron después del paso de centrifugación a 400 g por 5 min y las células se lavaron otras dos veces con 100 µl de PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃, cada lavado fue seguido por un paso de centrifugación (5 min a 400 g). Después, las células se tiñeron por 30 minutos a 4 °C con 50 µl de IgG anti-humano de cabra conjugado con rPE (AbD Serotec) diluido a 5 µg/ml con PBS complementado con 0.2% de BSA y 0.09% de NaN₃ y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Las células se volvieron a lavar y suspender en 200 µl de PBS con 0.2% BSA y 0.09% de NaN₃ y se transfirieron a una placa de 96 cavidades en forma de U (Corning) para citometría de flujo utilizando un dispositivo EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

Resultados:

Como un resultado, las concentraciones de los anticuerpos determinadas para utilizarse en el experimento de competencia fueron de 10 µg/ml o 100 µg/ml para los IgG (con la excepción de 9N10 en donde las concentraciones fueron de 1 µg/ml o 10 µg/ml) (datos no mostrados) y 4 µg/ml para los scFv (ver Figura 10).

Después de identificar las concentraciones correctas, se realizó el experimento de competencia actual.

Materiales y Métodos:

Las células objetivo CCRF-CEM, se cosecharon por centrifugación y

se lavaron dos veces en medio de cultivo RPMI-1640. Se mezcló ya sea 1 ml con 2.5×10^6 células (para los IgG) o 10 ml con 2.5×10^7 células (para los scFv) con Fluo-4-AM (acetoximetil éster; Invitrogen), Plurónico F-127 (Invitrogen) y Probenecid a concentraciones finales de 1 μ M, 0.02% y 1 mM respectivamente. Las células se incubaron a 37°C por 60 min en una rueda giratoria vertical (7 rpm). Todos los pasos posteriores se hicieron en la presencia de 1 mM de Probenecid. Las células se lavaron dos veces en RPMI-1640 con 10% de suero de becerro fetal (FCS), una vez en un regulador de pH de ensayo (145 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1 mM de NaH_2PO_4 , 0.8 mM de MgCl_2 , 25 mM de Hepes, 22 mM de glucosa) y después se volvieron a suspender a una densidad final de 4×10^6 células/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de células, regulador de pH de ensayo con o sin anticuerpos y ligando (SDF-1 α). Los primeros dos componentes (células y anticuerpos) se pre-incubaron por 15 min antes de la adición del ligando, SDF-1 α (concentración final 50 ng/ml). Las concentraciones finales del anticuerpo fueron 10 μ g/ml o 100 μ g/ml para los IgG y 4 μ g/ml para los scFv. Las muestras se analizaron inmediatamente utilizando el filtro de paso de banda de 515-545 nm en un a FACSCanto II (BD Biosciences). Las áreas bajo las curvas (AUC) se integraron utilizando el software Prism (GraphPad) y graficaron como porcentaje de AUC para estimulación máxima con SDF-1 α solo.

Resultados:

Al nivel de scFv, se demostró la actividad antagónica mediante las variantes C-9P21 y D-1K21. C-1I24 desplegó también algo de efecto antagónico. No se demostró actividad por medio de B-1M22 (Figura 11A).

Al nivel de IgG, la inhibición de la señalización inducida por SDF-1 α se demostró en cuatro de cinco anticuerpos ensayados: B-1M22, C-1I24, C-9P21 y 9N10 (Figura 11B, C, D y E). Por razones desconocidas, la variante D-1K21 parece ser solamente marginalmente inhibidora a una alta concentración en el formato IgG.

Además, ninguno de los anticuerpos fue capaz de inducir la señalización por sí mismo, es decir, los anticuerpos no mostraron actividad antagónica (datos no mostrados).

En conclusión, se demostró que todos los anticuerpos desplegaron un efecto antagónico en la señalización de Ca^{++} inducida por la unión de SDF1 α a CXCR4. C-9P21 y 9N10 tuvieron el efecto más prominente.

En un experimento más, se ensayó 9N10 al nivel de IgG para la habilidad para reducir el flujo de calcio inducido por ligando en comparación con

C-9P21.

Material y Métodos:

El experimento se realizó como se describe anteriormente, pero los anticuerpos se utilizaron en una serie de titulación con concentraciones de 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032, 0.064 y 0.00128 µg/ml.

Resultados:

Los resultados mostraron que 9N10 es aproximadamente ocho veces más eficiente en la inhibición del flujo de Calcio con un IC_{50} (nM) de 3.85 comparado con un IC_{50} (nM) de 29 para C-9P21 (ver Figura 12A y Figura 12B).

Ejemplo 7: Inhibición de la Migración de Célula Inducida por Ligando

La habilidad de scFv C-9P21 para reducir la migración celular inducida por ligando se evaluó en la línea de células CCRF-CEM CXCR4⁺. El fragmento scFv anti-GFP se utilizó como un control negativo y el anticuerpo anti-cMyc se utilizó para el entrelazamiento de ambos scFv para imitar el efecto de los anticuerpos en el formato IgG.

Materiales y Métodos:

Las células CCRF-CEM se mantuvieron como se describe anteriormente.

Las células objetivo CCRF-CEM se sedimentaron por centrifugación y se lavaron dos veces en medio de cultivo RPMI-1640 sin FCS. La densidad celular después se ajustó a 1×10^6 células/ml y 60 ml de esta suspensión se mezcló con 38 µl de BATDA [bis(acetoximetil)2,2':6',2''-terpiridin-6,6''-dicarboxilato] (Perkin Elmer, Waltham, MA). Las células se incubaron con BATDA a 37°C por 20 min con mezclado invirtiendo delicadamente el recipiente cada 10 min. Las células se lavaron tres veces en RPMI-1640 con 20% de FCS, y después se volvieron a suspender en RPMI-1640/20% de FCS a una densidad final de 2×10^7 células/ml. Las células marcadas se mezclaron con un volumen igual de medio conteniendo 10% de FCS, el anticuerpo anti-c-myc (clon 9E10) y diluciones seriales de 1/2 de scFv C-9P21, de esta forma resultando en concentraciones de anticuerpo finales de 20 µg/ml y 32 µg/ml a 16 ng/ml para IgG anti-cMyc y scFv C-9P21, respectivamente. El scFv anti-GFP se utilizó a 32 µg/ml como un control negativo en combinación con 20 µg/ml del anticuerpo anti-cMyc. En paralelo, 30 µl de RPMI conteniendo 0.15 nM del ligando SDF-1α se agregaron en un compartimiento inferior de una placa de cámara Boyden de 96 cavidades ChemoTX (Neuro Probe, Gaithersburg, MD). Las células marcadas con BATDA recubiertas con 50 µl del

anticuerpo después se agregaron al compartimiento superior de la placa de cámara de 96 cavidades ChemoTX y se incubaron en la presencia a 37°C por 2.5 hr. Las células arriba del filtro después se removieron y el filtro se lavó con PBS seguido por centrifugación de la placa para recolectar todas las células en la cámara inferior antes de remover el filtro. La placa después se invirtió en la parte superior de una placa en forma de V seguido por centrifugación. Las células en la placa en forma de V se lavaron con 100 µl de PBS, sedimentaron por centrifugación y se volvieron a suspender en 35 µl de PBS con 1.3% de Tritón X-100. Las muestras se transfirieron a una placa de microtitulación de 906 cavidades negra, se mezclaron con 200 µl de Solución de Europio (Perkin Elmer), y analizaron por emisión de fluorescencia (excitación a 340 nm, emisión a 613 nm, tiempo de retraso 0.4 ms y tiempo de integración 0.4 ms) utilizando un lector de placas TECAN M200. Para cada concentración del anticuerpo, la proporción de señales en la presencia/ausencia de scFv y el porcentaje de inhibición de la migración se calcularon. Los datos se graficaron y analizaron mediante la adaptación de la curva de regresión no lineal utilizando el modelo de “log(inhibidor) frente a respuesta” del software Prism (GraphPad).

Resultados:

Los datos demuestran la inhibición de la quimiotaxis inducida por SDF-1 de células CCRF-CEM en la presencia de anti-CXCR4 scFv C-9P21 (ver Figura 13). Bajo estas condiciones, se calculó el valor IC_{50} (concentración del anticuerpo que conduce a 50% de inhibición de la migración celular) como 2.9 µg/ml y se obtuvo una inhibición del 100% a una concentración de scFv de 20 µg/ml. El fragmento scFv anti-GFP (control negativo) no mostró inhibición de la migración celular (datos no mostrados).

De esta forma, el anticuerpo C-9P21 en un formato scFv inhibe la migración inducida por ligando de células CXCR4⁺ CCRF-CEM con un valor IC_{50} de 2.9 µg/ml (~100 nM) y demuestra 100% de inhibición a 20 µg/ml (0.7 µM).

Ejemplo 8: Inducción de la Citotoxicidad Celular Dependiente del Anticuerpo (ADCC)

Un mecanismo potencial a través del cual un anticuerpo puede ser terapéuticamente útil es la habilidad para mediar la ADCC de células objetivo que expresan CXCR4, si se aniquila la célula objetivo es el modo preferido de acción. Esto se ensayó utilizando células CCRF-CEM que se derivan de linfoma de célula T y tienen expresión constitutiva de CXCR4. Los anticuerpos seleccionados se ensayaron ambos como fragmentos scFv entrelazados con el anticuerpo anti-cMyc

y como anticuerpos IgG1 completamente humanos.

Materiales y Métodos:

Las células CCRF-CEM se mantuvieron como se describe anteriormente.

Las células CCRF-CEM objetivo, se sedimentaron por centrifugación y lavaron dos veces en medio RPMI-1640. Se mezclaron 2.5×10^6 células/ml con calceína-AM (Invitrogen) a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ e incubaron a 37°C por 30 min. Las células se lavaron tres veces en medio RPMI-1640 complementado con 10% de FCS y la densidad celular se ajustó a 3×10^5 células/ml. Se prepararon PBMC humanos de sangre fresca del donador mediante centrifugación de gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield, Liverpool, UK), se lavaron RPMI-1640/10% de FCS y almacenaron congelados en RPMI con 10% de FCS y 10% de DMSO a una densidad de 3×10^7 células/ml en nitrógeno líquido. Las células efectoras se descongelaron en el día del experimento, se lavaron en RPMI con 10% de FCS y volvieron a suspender a una densidad de 6×10^6 células/ml. Se mezclaron 50 μl de cada célula objetivo y efectora en las mismas cavidades de una placa de microtitulación de 96 cavidades, de esta forma proveyendo una proporción de célula efectora-a-objetivo (E:T) de 20:1. Los anticuerpos en formato IgG1 se agregaron a las mismas cavidades en un volumen de 100 μl dando como resultado un intervalo de concentración de 0.8 a 1000 ng/ml. Por consiguiente, los fragmentos scFv se agregaron en 20 μl en volumen para concentraciones finales de 2.5 a 5×10^4 ng/ml, después de haber sido premezcladas con un exceso (20 $\mu\text{g/ml}$) del anticuerpo IgG1 anti-cMyc quimérico (variable de ratón/constante humana) (derivado del hibridoma 9E10). La placa de microtitulación se incubó por 4 hrs a 37°C . Después de 3 hrs y 45 min de incubación, se agregaron 20 μl de 0.9% de Triton-X100 a las cavidades de control para lograr la lisis completa de las células objetivo (lisis máxima). Después se transfirieron 100 μl de sobrenadante de cada muestra a una placa de microtitulación negra y se registraron la fluorescencia (excitación a 488 nm, emisión a 518 nm) utilizando un lector de placas TECAN M200. Cada experimento se llevó a cabo por cuadruplicado. La intensidad de fluorescencia de las muestras sin anticuerpos se sustrajo como un fondo y se calculó el porcentaje de la lisis específica en las muestras con anticuerpos. Las curvas de dosis-respuesta se calcularon mediante análisis de regresión no lineal y un modelo de adaptación de tres parámetros utilizando el software Prism (GraphPad).

Resultados:

Los resultados mostrados en la Figura 14 demuestran que todos los anticuerpos anti-CXCR4 ensayados fueron incapaces de inducir ADCC tanto como scFv e IgG de longitud completa en la presencia de PBMC humanos con una aniquilación máxima alcanzando el 100%. Los scFv e IgG ensayados pueden clasificarse a su aniquilación máxima como sigue: C-9P21 > D-1K21 (scFv); y B-1M22 > C-1I24 ~ C-9P21 > D-1K21 (IgG) (ver también la Tabla A).

Tabla A. Actividad ADCC Comparativa de los Anticuerpos anti-CXCR4 Ensayados anticuerpos.

Anticuerpo	Aniquilación Max (%)		EC ₅₀ (ng/ml)	
	scFv	IgG	scFv	IgG
B-1M22	ND	100	ND	115.7 (0.8 nM)
C-1I24	ND	65	ND	49.2 (0.3 nM)
C-9P21	96.4	63.5	2.7 (0.09 nM)	1852.0 (12.3 nM)
D-1K21	68.6	25.7	18.8 (0.7 nM)	79.9 (0.5 nM)

ND, no hecho

De esta forma, todos los anticuerpos anti-CXCR4 ensayados demostraron actividad ADCC frente a células CCRF-CEM, B-1M22 y C-9P21 demostrando la aniquilación celular máxima mayor.

Ejemplo 9: Inducción de Citotoxicidad Celular Dependiente del Complemento (CDC)

Para ensayar si los IgG anti-CXCR4 descritos en la presente son capaces de mediar la citotoxicidad dependiente del complemento, se han realizado experimentos CDC utilizando células Ramos que se derivan de linfoma de célula B de Burkitt y tiene expresión constitutiva de CXCR4.

Materiales y Métodos:

Las células Ramos se mantuvieron como se describe anteriormente.

La habilidad de los IgG B-1M22, C-1I24, C-9P21 y D-1K21 para inducir CDC se evaluó en la línea de células Ramos CXCR4+ natural. Las células Ramos, se sedimentaron por centrifugación y lavaron dos veces en medio de cultivo RPMI-1640. Se mezclaron 2.5×10⁶ células/ml con calceína-AM (Invitrogen) a una concentración final de 10 µM y después se incubaron a 37°C por 30 min. Las células se lavaron tres veces en RPMI-1640 con 10% de FCS y la densidad

celular se ajustó a 4×10^6 células/ml. Una alícuota de 25 μ l células objetivo marcadas y 25 μ l de suero humano se mezclaron en las cavidades de una placa de microtitulación de 96 cavidades. Las diluciones de los anticuerpos (todos en el formato IgG) se agregaron a las mismas cavidades en 50 μ l en volumen de esta forma resultando en una concentración de anticuerpo final de 5×10^{-5} a 5×10^4 ng/ml. Se agregaron 20 μ l de 0.9% de Triton-X100 a las cavidades de control para obtener la lisis completa de las células objetivo (definiendo una lisis máxima de 100%). La placa de microtitulación se incubó por 1 hr a 37°C. Se agregaron 100 μ l de RPMI-1640 con 10% de FCS a todas las cavidades por centrifugación y se transfirieron 100 μ l de sobrenadante de cada muestra a una placa de microtitulación negra. Se registró la fluorescencia (excitación a 488 nm, emisión a 518 nm) utilizando un lector de placas TECAN M200. Cada experimento se llevó a cabo por cuádruplicado. La intensidad de fluorescencia de las muestras sin anticuerpos se sustrajo como un fondo y el porcentaje de la lisis específica en las muestras con anticuerpos se calculó. Las curvas de dosis-respuesta se calcularon mediante análisis de regresión no lineal y un modelo de adaptación de tres parámetros utilizando el software Prism (GraphPad).

Resultados:

Los resultados mostrados en la Figura 15A y la Figura 15B demostraron que el anticuerpo C-1I24 fue capaz de inducir CDC en presencia de suero humano. C-1I24 mostró un valor EC₅₀ de 0.7 μ g/ml y una aniquilación máxima de 100%. También se observó algo de actividad CDC para la variante B-1M22, sin embargo, solamente a una muy alta concentración (100 g/ml). F7 se utilizó como un anticuerpo de control positivo.

De esta forma, de los anticuerpos descritos en la presente, dos anticuerpos, C-1I24 y B-1M22, demostraron actividad CDC contra células Ramos. C-1I24 mostró una actividad CDC superior.

Ejemplo 10: Inducción de Apoptosis

La habilidad de los anticuerpos anti-CXCR4 para inducir apoptosis se evaluó en la línea de células Ramos CXCR4+.

Materiales y Métodos:

Las células Ramos se cultivaron como se describe anteriormente.

Las células Ramos se cosecharon por centrifugación, lavaron dos veces en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de FCS y se volvieron a suspender en medio RPMI-1640 con 10% de FCS a una densidad de 3×10^5 células/ml. La suspensión celular (250 μ l) se mezcló con el mismo volumen de

cualquier anticuerpo a ser ensayados en diluciones (concentración final de 0.08 a 10 µg/ml) o estaurosporina (25 nM) en cavidades de una placa de 24 cavidades e incubaron a 37°C por 48 hrs. Las células se recolectaron por centrifugación y lavaron en Regulador de pH de Unión de Anexina V (10 mM de Hepes, 140 mM de NaCl, 2.5 mM de CaCl₂, 0.2% de BSA, pH 7.4). Las células se cosecharon de nuevo y se volvieron a suspender en 300 µl de Regulador de pH de Unión de Anexina V. Ambos, la Anexina V y el yoduro de propidio conjugados con FITS (PI) se mezclaron en una suspensión celular de 240 µl resultando en una concentración final de PI de 0.2 µg/ml. Las muestras se analizaron inmediatamente después de agregar el ligando utilizando los filtros de paso de banda de 515-545 nm y 610/20 nm en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). Las células apoptóticas se definieron como positivas para Anexina V / negativas para PI y las células muertas se definieron como positivas para PI.

Resultados:

Los resultados presentados en la Figura 16A (B-1M22, C-1I24, C-9P21 y D-1K21) demostraron que no se indujo apoptosis por arriba del nivel de fondo (nivel de control negativo, marcado como 0 en la Figura 16A, en la presencia de los anticuerpos B-1M22, C-1I24, C-9P21, y D-1K21. En contraste, el F7 IgG1 de control indujo apoptosis en todas las concentraciones utilizadas en el ensayo. Los resultados presentados en la Figura 16B demuestran que los anticuerpos C-9P21 y 9N10 no inducen apoptosis significativa.

De esta forma, estos resultados demuestran que los anticuerpos descritos en la presente no inducen la apoptosis de células CXCR4-positivas, que pueden proveer un perfil de efectos secundarios potencialmente superior en comparación con F7.

Tabla 1

SE C ID NO:	scFv C-9P21	
25	Cadena pesada FR1:	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFS
1	CDR 1:	SYWMH
26	FR 2	WVRQAPGKGLVWVS

SE C ID NO:	scFv C-9P21	
2	CDR 2:	RINSDGSSTSYADSVKG
27	FR 3:	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3	CDR 3:	KILGVGARSRRYFDY
28	FR 4:	WGQGTMVTVSS
29	Enlazador:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
30	Cadena Ligera FR1:	ETTLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
4	CDR 1:	RASQSVVSNYLA
31	FR 2	WYQQKPGQAPRLIS
5	CDR 2:	GASNRAT
32	FR 3:	GISDRFSGSGSGADFTLTISRVEPEDSAVYYC
6	CDR 3:	QQFDKSTWT
33	FR 4:	FGQGTKVEIK
34	scFv C- 9P21n.a.	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTG GGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAG CTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA TGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAG GTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC AATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTTTCAGGGAGTGC ATCCGCCCCAAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGA AGCACGCGTAGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAG GCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGTCAGCAA CTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTCTGGTGCATCCAACAGGG

SE C ID NO:	scFv C-9P21	
		CCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGG TCTGGGGCAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAGTC GAGCCTGAAGACTCAGCAGTGTATTACTGTCAACAG TTTGATAAGTCCACGTGGACGTTCGGCCAAGGGAC CAAGGTGGAAATCAAA
35	scFv C- 9P21 a.a.	QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRINDGSSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRR YFDYWGQGTMVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARV ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVVSNYLAWY QQKPGQAPRLLISGASNRAATGISDRFSGSGSGADFTL TISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIK
69	V _{H(aa)}	QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRINDGSSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRR YFDYWGQGTMVTVSS
70	V _{L(aa)}	ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVVSNYLAWY QQKPGQAPRLLISGASNRAATGISDRFSGSGSGADFTL TISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIK
77	Dominio VH (nt)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTG GGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAG CTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA TGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAG GTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC AATGGTCACCGTCTCTTCA
78	Dominio VL (nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG

SE C ID NO:	scFv C-9P21	
		GGCCAGTCAGAGTGTTGTCAGCAACTATTTAGCCTG GTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCC TCATCTCTGGTGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCT CAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGGCAGAC TTC ACTCTCACCATCAGCAGAGTCGAGCCTGAAGAC TCAGCAGTGTATTACTGTCAACAGTTTGATAAGTCCA CGTGGACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC AAA

Tabla 2

SE C ID N O:	scFv B-1M22	
36	Cadena Pesada FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFS
7	CDR 1:	SYAIS
37	FR 2	WVRQAPGQGLEWMG
8	CDR 2:	GIIPFGTANYAQKFQG
38	FR 3:	RVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	CDR 3:	DRERWLQSAGDY
39	FR 4:	WGQGT LVT VSS
40	Enlazador:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
41	Cadena Ligera FR1:	QPVLTQSPSVSVAPGQTARITC
10	CDR 1:	GGNNIGSKSVH
42	FR 2	WYQQKPGQAPVLV VY
11	CDR 2:	DDSDRPS

SE C ID N O:	scFv B-1M22	
43	FR 3:	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC
12	CDR 3:	QVWDSSSDHWV
44	FR 4:	FGGGTKLTVL
45	scFv B- 1M22 n.a.	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT CTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGT GCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG AGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCA CAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGC CTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGGCGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAAA GCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAACTTGAAGAA GGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGCCTGTGCTGA CTCAGTCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGA CGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAA GTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCC AGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCG GCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC TCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTC GAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTG TGGGATAGTAGTAGTGATCATTGGGTGTTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTA
46	scFv B- 1M22 a.a.	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGII PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDRER WLQSAGDYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSE ARVQPVLTSPPSV

SE C ID N O:	scFv B-1M22	
		SVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVY DDSDRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHW VFGGGTKLTVL
71	V _{H(aa)}	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGII PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDRER WLQSAGDYWGQGTLVTVSS
72	V _{L(aa)}	QPVLTQSPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLWYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDSSSDHWVFG GGTKLTVL
79	Dominio VH (nt)	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT CTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGT GCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG AGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCA CAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGAC GAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGC CTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA GAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGCGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
80	Dominio VL (nt)	CAGCCTGTGCTGACTCAGTCACCCTCGGTGTCAGTGG CCCCAGGACAGAC GGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGT AAAAGTGTGCACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGG TCGTCTATGATGAT

SE C ID N O:	scFv B-1M22	
		AGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCT GGCTCCAACCTCTGG GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGC CGGGGATGAGGCCG ACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCAT TGGGTGTTCCGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 3

SE C ID N O:	scFv C-1I24	
47	Cadena pesada FR1:	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFS
13	CDR 1:	SYGMH
48	FR 2	WVRQAPGKGLEWVA
14	CDR 2:	VISYDGSNKYYADSVKG
49	FR 3:	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
15	CDR 3:	DLPITRGTGADY
50	FR 4:	WGQGTLVTVSS
51	Enlazador:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
52	Cadena Ligera FR1:	QSVLIQPASVSGSPGQSITISC
16	CDR 1:	TGTSSDVGGYNYVS

SE C ID N O:	scFv C-1124	
53	FR 2	WYQQHPGKAPRLMIY
17	CDR 2:	DVTSRPS
54	FR 3:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
18	CDR 3:	SSYAGSYSVV
55	FR 4:	FGGGTKVTVL
56	scFv C-1124 n.a.	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG GAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAG ATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCT CAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAAAC TTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAC AGTCTGTCCTGATTCAGCCTGCCTCCGTGTCTG GGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCA CTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACT ATGTCTCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAAG CCCCCAGACTCATGATTTACGATGTCACTAGTCG GCCCTCAGGGGTTTCGAATCGCTTCTCTGGCTC CAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTC TGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTA CTGCAGTTCATATGCAGGCAGCTACAGCGTGGT ATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA
57	scFv C-1124 a.a.	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG

SE C ID N O:	scFv C-1124	
		RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPI TRGTGADYWGQGTLVTVSSKLSGSASAPKLEEGE FSEARVQSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYNVSWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYSV VFGGGTKVTVL
73	V _{H(aa)}	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPI TRGTGADYWGQGTLVTVSS
74	V _{L(aa)}	QSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYNV SWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYSV VFGG GTKVTVL
81	Dominio VH (nt)	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATG GAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAG ATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCT CA
82	Domino VL (nt)	CAGTCTGTCCTGATT CAGCCTGCCTCCGTGTCT GGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAAC TATGTCTCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAA

SE C ID N O:	scFv C-1124	
		GCCCCCAGACTCATGATTTACGATGTCACTAGTC GGCCCTCAGGGGTTTCGAATCGCTTCTCTGGCT CCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCT CTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATT ACTGCAGTTCATATGCAGGCAGCTACAGCGTGG TATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

Tabla 4

SE C ID N O:	scFv D-1K21	
58	Cadena pesada FR1:	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
19	CDR 1:	GYMH
59	FR 2	WVRQAPGQGLEWMG
20	CDR 2:	RINPNSGGTNYAQKFQG
60	FR 3:	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
21	CDR 3:	RNLIAARPRNRGRDAFDI
61	FR 4:	WGQGTMVTVSS
62	Enlazador:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
63	Cadena ligera FR1:	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC
22	CDR 1:	RASQSIGGSLA
64	FR 2	WYQQKPGKGPNNLIY
23	CDR 2:	AASTLQS
65	FR 3:	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDSATYYC
24	CDR 3:	QHYESYPLS

SE C ID N O:	scFv D-1K21	
66	FR 4:	FGGGTKLEIK
67	scFv D-1K21 n.a.	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTT CACCGGCTACTATA TGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT GAGTGGATGGGACGG ATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAG AAGTTTCAGGGCAG GGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAG CCTACATGGAGCTGA GCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACT GCGCGAGGCGTAAC CTGATAGCAGCTCGTCCCCGGAATCGGGGCAGGGA TGCTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCT TTCAGGGAGTGCAT CCGCCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAG CACGCGTAGACATC CAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGT CACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGGTGG CTCGTTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTCCTGA TCTATGCTGCATCC ACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGAC AGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGA AGATTCTGCAACTT ACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCCCTCTCTTT

SE C ID N O:	scFv D-1K21	
		CGGCGGCGGGACC AAGCTGGAGATCAAA
68	scFv D-1K21 a.a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHW VRQAPGQGLEWMGR INPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCARRN LIAARPRNRGRDAFDIWGQGTMVTVSSKLSGSASAPK LEEGEFSEARVDI QMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGGSLAWYQQK PGKGPNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDSATYYCQH YESYPLSFGGGT KLEIK
75	V _{H(aa)}	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHW VRQAPGQGLEWMGR INPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCARRN LIAARPRNRGRDAFDIWGQGTMVTVSS
76	V _{L(aa)}	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGGSLAWYQQ KPGKGPNLLIYA ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDSATYYC QHYESYPLSFGG GTKLEIK
83	Dominio VH (nt)	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTC AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTT CACCGGCTACTATA TGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT GAGTGGATGGGACGG ATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACTATGCACAG

SE C ID N O:	scFv D-1K21	
		AAGTTTCAGGGCAG GGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAG CCTACATGGAGCTGA GCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACT GCGCGAGGCGTAAC CTGATAGCAGCTCGTCCCCGGAATCGGGGCAGGGA TGCTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
84	Dominio VL (nt)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCT GCATCTGTAGGAGA CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTAT TGGTGGCTCGTTGG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAAC CTCCTGATCTATGCT GCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATC TGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTCTG CAACTTACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCCCT CTCTTTCGGCGGC GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Tabla 5

SE C ID N O:	scFv 9N10	
--------------------------	-----------	--

SE C ID N O:	scFv 9N10	
25 o 91	Cadena Pesada FR1:	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFS
1 o 85	CDR 1:	SYWMH
26 o 92	FR 2	WVRQAPGKGLVWVS
2 o 86	CDR 2:	RINSDGSSTSYADSVKG
27 o 93	FR 3:	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3 o 87	CDR 3:	KILGVGARSRRYFDY
28 o 94	FR 4:	WGQGTMVTVSS
95	Enlazador:	KLSGSASAPKLEEGEFSEARV
96	Cadena ligera FR1:	DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINC
88	CDR 1:	KSSQSVLHSSNNKNYLA
97	FR 2	WYQQKPGQPPKLLIY
89	CDR 2:	WASTRES
98	FR 3:	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLPEDVAFYYC
90	CDR 3:	LQYSTFPRT
33 o 99	FR 4:	FGQGTKVEIK

SE C ID N O:	scFv 9N10	
10 0	scFv 9N10 n.a.	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTG GGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAG CTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA TGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAG GTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC AATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTTTCAGGGAGTGC ATCCGCCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGA AGCACGCGTAGATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGA CTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCA TCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACACAGCT CCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGA AACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGG CATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTC AGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC CATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATGTGGCTTTTTA CTACTGTCTGCAATATTCTACTTTTCCTCGGACGTTC GGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
10 1	scFv 9N10 a.a.	QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRR YFDYWGQGTMVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARV DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISNLQPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQGTKVEIK

SEC ID NO:	scFv 9N10	
690102	V _H (aa)	QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRR YFDYWGQGTMVTVSS
103	V _L (aa)	DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISNLQPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQGTKVEIK
770104	Dominio VH (nt)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT TCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTG GGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAG CTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA TGAAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAG GTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC AATGGTCACCGTCTCTTCA
105	Dominio VL (nt)	GATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCT GTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCATCAACTGCAA GTCCAGCCAGAGTGTTTTACACAGCTCCAACAATAA GAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACA GCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCG GGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCG GGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACC TGCAGCCTGAAGATGTGGCTTTTTACTACTGTCTGC AATATTCTACTTTTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA

SEC ID NO: 85 es idéntica a SEC ID NO: 1
SEC ID NO: 92 es idéntica a SEC ID NO: 26
SEC ID NO: 86 es idéntica a SEC ID NO: 2
SEC ID NO: 93 es idéntica a SEC ID NO: 27
SEC ID NO: 87 es idéntica a SEC ID NO: 3
SEC ID NO: 94 es idéntica a SEC ID NO: 28
SEC ID NO: 99 es idéntica a SEC ID NO: 33
SEC ID NO: 102 es idéntica a SEC ID NO: 69
SEC ID NO: 104 es idéntica a SEC ID NO: 77

Tabla 6 Secuencias IgG de C-9P21

SEC ID NO: 106	Cadena pesada IgG1(nt)	<u>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAG</u> <u>TTCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA</u> <u>GCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCA</u> <u>CTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTG</u> <u>TGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCAC</u> <u>AAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC</u> <u>ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCT</u> <u>GCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCT</u> <u>GTGTATTACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGG</u> <u>AGCTAGGTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCC</u> <u>AGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACC</u> <u>AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC</u> <u>CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC</u> <u>TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC</u> <u>GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC</u> <u>GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG</u> <u>ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT</u> <u>CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC</u> <u>GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA</u> <u>GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACA</u> <u>CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG</u> <u>GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCA</u> <u>AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC</u>
----------------------	------------------------------	--

		ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
SEC ID NO: 107	Cadena ligera kappa (nt)	<u>GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT</u> <u>CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC</u> <u>AGGGCCAGTCAGAGTGTTGTCAGCAACTATTTAGC</u> <u>CTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGG</u> <u>CTCCTCATCTCTGGTGCATCCAACAGGGCCACTGG</u> <u>CATCTCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG</u> <u>GCAGACTTCACTCTACCATCAGCAGAGTCGAGCC</u> <u>TGAAGACTCAGCAGTGTATTACTGTCAACAGTTTG</u> <u>ATAAGTCCACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAA</u> <u>GGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG</u> TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA

		GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
SEC ID NO:108	Cadena pesada IgG1(aa)	<u>QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMH</u> <u>WVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTIS</u> <u>RDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARS</u> <u>RRYFDYWQGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> <u>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN</u> <u>TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u> <u>PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS</u> <u>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
SEC ID NO: 109	Cadena ligera Kappa (aa)	<u>ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVVSNYLAW</u> <u>YQQKPGQAPRLISGASNRATGISDRFSGSGSGADE</u> <u>TLTISRVEPEDSAVYYCQQFDKSTWTFGQGTKVEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> <u>VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL</u> <u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

Tabla 7 Secuencias IgG de B-1M22

SEC ID NO: 110	Cadena pesada IgG1(nt)	<u>CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA</u> <u>AGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA</u> <u>GGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATC</u> <u>AGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT</u> <u>GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTA</u> <u>CAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGT</u> <u>CACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCC</u> <u>TACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAGAG</u> <u>ATGGCTACAATCCGCGGGCGACTACTGGGGCCAG</u> <u>GGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCA</u> <u>AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTC</u>
----------------------	------------------------------	--

		CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEC ID NO: 111	Cadena ligera lambda (nt)	<u>CAGCCTGTGCTGACTCAGTCACCCTCGGTGTCAG</u> <u>TGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGG</u> <u>GGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGG</u> <u>TACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTG</u> <u>GTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGA</u> <u>TCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAA</u> <u>CACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCC</u>

		<u>GGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGG</u> <u>ATAGTAGTAGTGATCATTGGGTGTTCCGGCGGAGG</u> <u>GACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCT</u> GCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTG AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTG TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAG GCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAA GCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAG CCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGC TACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
SEC ID NO: 112	Cadena pesada IgG1(aa)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIS</u> <u>WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT</u> <u>ADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRERWLQS</u> <u>AGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEC ID NO: 113	Cadena Ligera Lambda (aa)	<u>QPVLTSQSPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWY</u> <u>QQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA</u> <u>TLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKL</u> <u>TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY</u> PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS

Tabla 8 Secuencias IgG de C-1124

SEC ID NO: 114	Cadena pesada IgG1(nt)	<u>CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGG</u> <u>TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC</u> <u>AGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGC</u> <u>ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGA</u> <u>GTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATA</u> <u>AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACC</u> <u>ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT</u> <u>GCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCT</u> <u>GTGTATTACTGTGCGAAAGATCTTCCGATTACCCG</u> <u>CGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC</u> <u>CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAG</u> <u>CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG</u> <u>GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT</u> <u>CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA</u> <u>CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT</u> <u>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG</u> <u>CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA</u> <u>ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA</u> <u>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG</u> <u>CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA</u> <u>CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA</u> <u>CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT</u> <u>GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA</u> <u>GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAG</u> <u>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC</u> <u>AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC</u> <u>ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG</u> <u>AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA</u> <u>GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG</u> <u>GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC</u> <u>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA</u> <u>GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC</u> <u>GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC</u> <u>CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT</u>
-------------------	------------------------------	---

		GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
SEC ID NO: 115	Cadena ligera lambda (nt)	<u>CAGTCTGTCCTGATT</u> <u>CAGCCTGCCTCCGTGTCTGG</u> <u>GTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTG</u> <u>GAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTC</u> <u>TCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAG</u> <u>ACTCATGATTTACGATGTCACTAGTCGGCCCTCAG</u> <u>GGGTTTCGAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC</u> <u>AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG</u> <u>CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTTCATAT</u> <u>GCAGGCAGCTACAGCGTGGTATTCGGCGGAGGGA</u> <u>CCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGC</u> CCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGG AGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTC ATAAGTGACTIONCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGG AGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACA ACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGAC GCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGA AGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
SEC ID NO: 116	Cadena pesada IgG1(aa)	<u>QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS</u> <u>RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPIRGTG</u> <u>ADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEC ID NO: 117	Cadena ligera lambda	<u>QSVLIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW</u> <u>YQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRFSGSKSGNTA</u> <u>SLTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYSVVFGGGTKVTVL</u> GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Tabla 9 Secuencias IgG de D-1K21

SEC ID NO: 118	Cadena pesada IgG1(nt)	<u>CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACT</u> <u>GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAA</u> <u>ACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGA</u> <u>CCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAG</u> <u>CTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGCGCGAGGCGTAACCTGATAGCAGCTCGTC</u> <u>CCCGGAATCGGGGCAGGGATGCTTTTGATATCTGG</u> <u>GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTC</u> CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
----------------------	------------------------------	--

		GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEC ID NO: 119	Cadena ligera kappa (nt)	<u>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCT</u> <u>GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCG</u> <u>GGCCAGTCAGAGTATTGGTGGCTCGTTGGCCTGGT</u> <u>ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTCCTG</u> <u>ATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCA</u> <u>TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATT</u> <u>CACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTC</u> <u>TGCAACTTACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCC</u> <u>CTCTCTTTCGGCGGGCGGGACCAAGCTGGAGATCAA</u> <u>ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC</u> GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
SEC	Cadena	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHW</u>

ID NO: 120	pesada IgG1(aa)	<u>VRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMT</u> <u>RDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARRNLIAARPRNR</u> <u>GRDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEC ID NO: 121	Cadena ligera kappa (aa)	<u>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSIGGSLAWYQ</u> <u>QKPGKGPNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLI</u> <u>SSLQPEDSATYYCQHYESYPLSFGGGTKLEIKRTVAAP</u> SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 10 Secuencias IgG de 9N10

SEC ID NO: 106 o 122	Cadena pesada IgG1(nt)	<u>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGT</u> <u>TCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACT</u> <u>GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTG</u> <u>GGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTAGCACAAG</u> <u>CTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT</u> <u>CCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAA</u> <u>TGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAT</u> <u>TACTGTGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAG</u> <u>GTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>AATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCC</u> CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
-------------------------------	------------------------------	---

		TGGA^{ACT}CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA^{CAC} CTTCCC^{GG}CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAA^{ACT}CACACATGCC^{CACCG} TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCC^{AAA}ACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCC^{GG}ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCC^{CCC}CATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA^{ACT}TACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA^A
SEC ID NO: 123	Cadena ligera kappa (nt)	<u>GATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCT</u> <u>GTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCATCAACTGCAA</u> <u>GTCCAGCCAGAGTGTTTTACACAGCTCCAACAATAA</u> <u>GAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACA</u> <u>GCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCG</u> <u>GGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCG</u> <u>GGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACC</u> <u>TGCAGCCTGAAGATGTGGCTTTTTACTACTGTCTGC</u> <u>AATATTCTACTTTTCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGA</u> <u>CCAAGGTGGAGATCAAACGA</u>ACTGTGGCTGCACCA

		TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGT
SEC ID NO: 108 o 124	Cadena pesada IgG1(aa)	<u>QVQLQESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSSYWMHWVR</u> <u>QAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNT</u> <u>LYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSRRYFDYWGQG</u> <u>TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF</u> PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEC ID NO: 125	Cadena ligera kappa (aa)	<u>DIVLTQTPDSLAVSLGETTTINCKSSQSVLHSSNNKNYL</u> <u>AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DFTLTISNLPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 11

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
126	VH CDR1	S/G Y X ₃ M/I H/S
127	VH CDR1	X ₁ Y X ₃ M H
128	VH CDR1	S Y X ₃ M H
129	VH CDR2	X ₁ I X ₃ X ₄ D G S X ₈ X ₉ X ₁₀ Y A D S V K G
130	VH CDR2	V/R I S/N Y/S D G S N/S K/T Y/S Y A D S V K G
131	VH CDR2	X ₁ I X ₃ P X ₅ X ₆ G X ₈ X ₉ N Y A Q K F Q G
132	VH CDR2	R/G I N/I P N/I S/F G G/T T/A N Y A Q K F Q G

REFERENCIAS

Las siguientes referencias, al grado en el que proporcionan un procedimiento ilustrativo u otros detalles complementarios para los presentados en la presente, se incorporan específicamente en la presente por referencia.

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997.

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", FEBS Lett., 414:521-526, 1997.

Baeverle and Gires, BJC, 96: 417-423, 2007.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in Saccharomyces Cerevisiae", EMBO J., 6:229-234, 1987

Baribaud, Edwards, Sharron, Brelot, Heveker, Price, Mortari, Alizon, Tsang, Doms: "Antigenically Distinct Conformations of CXCR4" J. of Virology, 75(19): 8957-8967, 2001

Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", Cancer, 109(2):170-179, 2006.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign ADN into Mice by Microinjecting Eggs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(13):4438-4442, 1985.

Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in

Biology", SIAM J. Applied Math., 48:1073, 1988.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*", BioTechnology, 5:369, 1987.

Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:7-12, 1996.

Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," Annu. Rev. Biochem. 59:439-473, 1990.

Davies and Riechmann, "Antibody Dominio VHs as small recognition units", Biotechnology (NY), 13:475-479, 1995.

Devereux, Haeberli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", Nucleic Acids Res., 12:387, 1984.

Di Paolo and otros, "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity", Clin Cancer Res 9: 2837-48, 2003.

Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", J. Pept. Sci., 2(4): 212-22, 1996.

Goeddel, "Gene Expression Technology: Métodos in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.

Guleng, Tateishi, Ohta, Kanai, Jazag, Ijichi, Tanaka, Washida, Morikane, Fukushima, Yamori, Tsuruo, Kawabe, Miyagishi, Taira, Sata, Omata. "Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner". Cancer Res 65: 5864-71, 2005

Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring anticuerpos Devoid of Light Chains", Nature, 363(6428):446-448, 1993.

Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", Nature, 315:680-683, 1985.

Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, 1992.

Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929, 1978.

Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005.

Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995.

Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993

Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998.

Hu, Deng, Bian, Li, Tong, Li, Wang, Xin, He, Zhou, Xie, Wang, Cao. "The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma." *Clin Cancer Res* 11: 4658-65, 2005

Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.

Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5a. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.

Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6:187-195, 1987.

Kim, Lee, Midura, Yeung, Mendoza, Hong, Ren, Wong, Korz, Merzouk, Salari, Zhang, Hwang, Khanna, Helman. "Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases." *Clin Exp Metastasis* 25: 201-11, 2008

Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain anticuerpos in small-scale *Escherichia coli* cultures." *J Immunol Methods* 200: 69-77, 1997

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.

Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF α): a Putative α -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature α -Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.

Kwong, Kulbe, Wong, Chakravarty, Balkwill. "An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cell cancer cells." *Mol Cancer Ther* 8(7), 1893-1905, 2009

Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357-366, 2004.

Liang, Wu, Reddy, Zhu, Wang, Blevins, Yoon, Zhang, Shim. "Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA." *Biochem Biophys Res Commun* 363: 542-6, 2007

Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.

Marhaba and otros, "CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers", *Curr Mol Med* 8: 784-804, 2008.

Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.

Muller, Homey, Soto, Ge, Catron, Buchanan, McClanahan, Murphy, Yuan, Wagner, Barrera, Mohar, Verastegui, Zlotnik. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410: 50-6, 2001

Munz and otros, "The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation", *Oncogene* 23: 5748-58, 2004.

Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS*, 4:11-17, 1988.

Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.

Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.*, 7:248-254, 1995.

Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13: 1882-1891, 2004.

O'Brien and otros, "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice", *Nature* 445: 106-10, 2007.

Orimo, Gupta, Sgroi, Arenzana-Seisdedos, Delaunay, Naeem, Carey, Richardson, Weinberg. "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121: 335-48, 2005

Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.

Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-

Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.

Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.

Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.

Prang, Preithner, Brischwein, Göster, Wöppel, Müller, Steiger, Peters, Baeuerle, da Silva, "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines", *Br J Cancer*, 92(2):342-349, 2005.

Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007.

Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.

Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology*, 14:1239-1245, 1996.

Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene*, 54:113-123, 1987.

Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature*, 329:840, 1987.

Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.

Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.

Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165, 1983.

Spizzo y otros, "High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer", *Breast Cancer Res Treat* 86: 207-13, 2004.

Spizzo y otros, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer", *Gynecol Oncol* 103: 483-8, 2006.

Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.

van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001.

Varga y otros, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival", *Clin Cancer Res* 10: 3131-6, 2004.

Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.

Ward, Güssow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Coli*", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.

Went y otros, "Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers", *Br J Cancer* 94: 128-35, 2006.

Xu, Duda, Di Tomaso, Ancukiewicz, Chung, Lauwers, Samuel, Shellito, Czito, Lin, Poleski, Bentley, Clark, Willett, Jain. "Direct Evidence that Bevacizumab, an Anti-VEGF Antibody, Up-regulates SDF1 α , CXCR4, CXCL6 and Neuropilin 1 in Tumors from Patients with Rectal Cancer." *Cancer Res* 69(20) 7905-7910, 2009

Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.

Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.

Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')₂ Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656): 371-373, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado caracterizado porque se une al receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) y que no induce la apoptosis significativa de células que expresan CXCR4.

2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque no induce la apoptosis significativa de células que expresan CXCR4 si se utiliza a una concentración de ≥ 0.4 $\mu\text{g/ml}$.

3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque es capaz de inhibir la unión de un ligando a CXCR4, o es capaz de inhibir la migración de células inducida por ligando que expresan CXCR4, o es capaz de inhibir el flujo de calcio inducido por ligando en células que expresan CXCR4.

4. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de S/G Y X₃ M/I H/S (SEC ID NO: 126), o X₁ Y X₃ M H (SEC ID NO: 127) o S Y X₃ M H (SEC ID NO: 128);

en donde X₁ puede ser S o G, preferiblemente S;

X₃ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o W o Y o A, más preferiblemente W;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de X₁ I X₃ X₄ D G S X₈ X₉ X₁₀ Y A D S V K G (SEC ID NO: 129);

en donde X₁, puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente V o R, más preferiblemente R;

X₃ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente S o N, más preferiblemente N;

X₄ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente Y o S, más preferiblemente S;

X₈ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente N o S, más preferiblemente S;

X₉ puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente K o T, más preferiblemente T; y

X_{10} puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente Y o S, más preferiblemente S;

o una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de X_1 I X_3 P X_5 X_6 G X_8 X_9 N Y A Q K F Q G (SEC ID NO: 131);

en donde X_1 , puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente R o G, más preferiblemente R;

X_3 puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente N o I, más preferiblemente N;

X_5 puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente N o I, más preferiblemente N;

X_6 puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente S o F, más preferiblemente S;

X_8 puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o T, más preferiblemente G; y

X_9 puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente T o A, más preferiblemente T;

y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NOs: 3, 9, 15 o 21 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada.

5. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID

NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y/o

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 4 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(v) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(vi) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

6. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y/o

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(v) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 11 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(vi) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID

NO: 12 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

7. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 14 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 15 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y/o

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(v) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 17 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(vi) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 18 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

8. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 19 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 20 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 21 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y/o

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 22 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(v) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 23 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(vi) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 24 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

9. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque

(a) comprende por lo menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR y por lo menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR,

en donde la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 o una secuencia sustancialmente homóloga a la

misma;

(ii) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 2 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(iii) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 3 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y/o

en donde la región variable de cadena ligera comprende:

(iv) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 88 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

(v) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 89 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

(vi) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 90 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma;

en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácido comparada con la secuencia CDR dada, o en donde tal secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia CDR dada; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

10. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizado porque comprende uno de cada uno de los dominios CDR VH (i), (ii) y (iii), y uno de cada uno de los dominios CDR VL (iv), (v) y (vi).

11. Un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 5, caracterizado porque

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 69 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o un dominio VL de SEC ID NO: 70 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

12. Un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, o 6, caracterizado porque

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 71 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o un dominio VL de SEC

ID NO: 72 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

13. Un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, o 7, caracterizado porque

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 73 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o un dominio VL de SEC ID NO: 74 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

14. Un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, u 8, caracterizado porque

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 75 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o un dominio VL de SEC ID NO: 76 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

15. Un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 9, caracterizado porque

(a) tiene un dominio VH de SEC ID NO: 69 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o un dominio VL de SEC ID NO: 103 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; o

(b) es un anticuerpo que puede competir con el anticuerpo (a) para la unión a CXCR4.

16. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, caracterizado porque (b) puede unirse sustancialmente al mismo epítopo como tal anticuerpo (a).

17. Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque es un anticuerpo humano, preferiblemente un anticuerpo completamente humano.

18. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque comprende todo o una porción de

una región constante de cadena pesada del anticuerpo y/o una región constante de cadena ligera del anticuerpo.

19. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque es un anticuerpo IgG, preferiblemente un anticuerpo IgG1.

20. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 108 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 109 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

21. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 112 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 113 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

22. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 116 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 117 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

23. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18 o n 19, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 120 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 121 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

24. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 124 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo, y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 125 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

25. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado porque es un fragmento de unión a antígeno

de un anticuerpo.

26. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo es un Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpo de dominio individual, dímero TandAbs, Fv, scFv, dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpo lineal, minicuerpo, diacuerpo, fragmento de anticuerpo biespecífico, bicuerpo, tricuerpo, sc-diacuerpo, cuerpo kappa(lambda), BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, DART o un mimético de anticuerpo pequeño que comprende uno o más CDR.

27. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, caracterizado porque se une a por lo menos un segundo agente de diagnóstico o terapéutico.

28. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque se une a por lo menos un agente radioterapéutico, agente quimioterapéutico, agente anti-angiogénico, agente inductor de apoptosis, fármaco anti-tubulina, agente anti-celular o citotóxico, esteroide, antagonista de citocina, inhibidor de expresión de citocina, antagonista de quimiocina, inhibidor de expresión de quimiocina, inhibidor ATPase, agente antiinflamatorio, inhibidor de la trayectoria de señalización, agente anticancerígeno, otros anticuerpos, agente coagulante o anti-vírico, en donde el agente anti-vírico preferiblemente se selecciona del grupo que consiste de un nucleósido, inhibidor de transcriptasa inversa de nucleósido, inhibidor de transcriptasa inversa de no de nucleósido y un inhibidor de proteasa.

29. Un inmunoconjugado caracterizado porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 acoplado a por lo menos un segundo agente terapéutico o de diagnóstico.

30. Una composición caracterizada porque comprende al menos un primer anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 o uno de sus inmunoconjugados, en donde la composición es preferiblemente una composición farmacéuticamente aceptable..

31. La composición de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque además comprende al menos un segundo agente terapéutico.

32. Una molécula de ácido nucleico caracterizada porque comprende una región de la secuencia de nucleótido que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28.

33. La molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque comprende la región de la secuencia de

nucleótido que tiene la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 67 o SEC ID NO: 100, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.

34. Un vector de expresión caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 32 ó 33.

35. Una célula hospedera caracterizada porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 32 ó 33 o el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 34.

36. Un virus caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 32 ó 33 o el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 34.

37. Un kit caracterizado porque comprende, en al menos un primer envase:

(a) el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28;

(b) el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 29;

(c) la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30-31;

(d) la molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 ó 33;

(e) el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 34;

(f) la célula hospedera de conformidad con la reivindicación 35; o

(g) el virus de conformidad con la reivindicación 36.

38. Un método para producir un anticuerpo, caracterizado porque comprende:

(a) cultivar una célula hospedera que comprende el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 34 bajo condiciones efectivas para expresar el anticuerpo codificado; y

(b) obtener el anticuerpo expresado de tal célula hospedera.

39. Un método para la unión de CXCR4, caracterizado porque comprende poner en contacto una composición que comprende CXCR4 con el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, o uno de sus inmunoconjugados.

40. Un método para detectar CXCR4, caracterizado porque comprende poner en contacto una composición que se sospecha que comprende CXCR4 con el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-

28, o uno de sus inmunoconjugados, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejos entre el CXCR4 y tal anticuerpo y detectar los complejos así formados.

41. Un método para diagnosticar asociada con la expresión de CXCR4 en un animal, caracterizado porque comprende el paso de:

(a) poner el contacto una muestra de prueba tomada de tal animal con un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28 o uno de sus inmunoconjugados; opcionalmente

(b) medir o detectar la presencia y/o cantidad y/o ubicación del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba; y, opcionalmente

(c) comparar la presencia y/o cantidad del complejo de anticuerpo-antígeno en la muestra de prueba con un control

42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la muestra de prueba se aísla del animal y se pone en contacto con tal anticuerpo o inmunoconjugado *in vitro*.

43. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque el anticuerpo o inmunoconjugado se administran al animal, por lo tanto poniendo el contacto la muestra de prueba *in vivo*.

44. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41-43, caracterizado porque la enfermedad asociada con la expresión de CXCR4 es una enfermedad mediada por CXCR4, o una enfermedad tipificada por la proliferación aberrante de células CXCR4+, o una enfermedad tipificada por la sobre-expresión de CXCR4.

45. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41-43, caracterizado porque la enfermedad es cáncer, cáncer metastático, invasión de órganos por células cancerígenas, enfermedades asociadas con angiogénesis, una enfermedad inflamatoria o inmunitaria, un trastorno auto-inmunitario tal como artritis reumatoide, infección viral tal como infección por VIH, o una afección en donde se desea movilizar células madre de la médula espinal con el fin de restaurar el sistema inmunitario.

46. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41-45, caracterizado porque una cantidad aumentada de CXCR4 en tal muestra de prueba es el diagnóstico de tal enfermedad.

47. Un método para tratar una enfermedad o actividad asociada con la expresión de CXCR4 en un animal, caracterizado porque comprende administrar a un animal con la enfermedad, una cantidad terapéuticamente

efectiva del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, o uno de sus inmunoconjugados.

48. El método de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque la enfermedad asociada con la expresión o actividad de CXCR4 es una enfermedad mediada por CXCR4, o una enfermedad tipificada por la proliferación aberrante de células CXCR4+, o una enfermedad tipificada por la sobre-expresión de CXCR4.

49. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 47 a 48, caracterizado porque la enfermedad es cáncer, cáncer metastático, invasión de órganos por células cancerígenas, enfermedades asociadas con angiogénesis, una enfermedad inflamatoria o inmunitaria, un trastorno auto-inmunitario tal como artritis reumatoide, una infección viral tal como infección por VIH, o una afección en donde se desea movilizar células madres de la médula espinal con el fin de restaurar el sistema inmunitario.

50. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 47-49, caracterizado porque el anticuerpo o uno de sus inmunoconjugados causa uno o más de los siguientes:

- (a) inhibición de la unión de CXCR4 a por lo menos SDF-1;
- (b) inhibición de las respuestas celulares mediadas por CXCR4 a un ligando CXCR4, preferiblemente la inhibición de la liberación de los iones de calcio en respuesta a un ligando CXCR4, o para inhibir la migración de células inducida por el ligando que expresan CXCR4;
- (c) inducción de ADCC de células CXCR4+;
- (d) inducción de efectos antitumorales *in vivo*;
- (e) inducción de CDC de células CXCR4+;
- (f) inhibición de la formación de metástasis causada por un cáncer existente;
- (g) inhibición de células cancerígenas que invaden nuevos órganos;
- (h) inhibición de la atracción de células CXCR4+ a la estroma de tumor, y/o activación de tales células para crear un micro-entorno favorable para el tumor;
- (i) sensibilizar las células tumorales para el tratamiento con otros compuestos terapéuticamente efectivos..

51. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 47-50, caracterizado porque además comprende administrar

un segundo agente terapéutico al animal.

52. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41-51, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo bivalente o polivalente que comprende al menos dos fragmentos de unión a antígeno de tal anticuerpo.

53. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41-52, caracterizado porque el animal es un sujeto humano.

54. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o uno de sus inmunoconjugados, para usarse en terapia, formación de imágenes o diagnóstico.

55. El anticuerpo o inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 54, para usarse en terapia, formación de imágenes o diagnóstico de una afección asociada con la expresión o actividad de CXCR4.

56. El anticuerpo o inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque la enfermedad es como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 o 49.

Figura 1

CCATGGCC**CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCC**
NcoI |-----V_H Inicio (SEC ID No.34 Inicio)

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGT
CCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTA
GCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
TGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCA**AAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAACTT**
V_H Fin-----|HindIII--Enlazador Inicio
GAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCAC
Enlazador Fin ----- MluI--|-----V_L Inicio
CCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTG
TCAGCAACTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
TCTGGTGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG
GGCAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAGTCGAGCCTGAAGACTCAGCAGTGTATTACT
GTCAACAGTTTGATAAGTCCACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
(SEC ID No. 34 Fin)V_LFin-----|
GCGGCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATC**ACCA**
NotI cMyc-etiqueta
TCACCATCAC
His₆-etiqueta
QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD
|-----V_H Inicio (SEC ID No.35 Inicio)

GSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR
RYFDYWGQGTMTVSS**KLSGSASAPKLEEGEFSEARVETTLTQSPGTL**SLSPGE
V_H Fin-|-----Enlazador-----|-----V_L Inicio
RATLSCRASQSVVSNYLA**WYQQKPGQAPRL**ISGASNRATGISDRFSGSGSGAD
FTLTISRVEPEDSAVYYC**QQFDKSTWTFGQGT**KVEIKAAAGSEQKLISEEDLNS
(SEC ID No. 35 Fin)V_LFin-----|
HHHHHH

Figura 2

CCATGGCC**CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTCG**
NcoI |-----V_H Inicio (SEC ID No.45 Inicio)

GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGT

GCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTA

CAGCAAAC**TACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACG**

AGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTG

TGCGAGAGATCGGGAGAGATGGCTACAATCCGCGGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCC

TGGTCACTGTCTCCTCA**AAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAAAC**TTGAAGAAGGT
V_H Fin----|HindIII--Enlazador Inicio

GAATTTTCAGAAGC**CACGCGTACAGCCTGTGCTGACTCAGTCACCCTCGGTGT**CAGTGGC
Enlazador Fin --- MluI---|-----V_L Inicio

CCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGC

ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGAC

CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAC**TCTGGGAACACGGCCACCCT**

GACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATA

GTAGTAGTGATCATTGGGTGTT**CGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGCGGCCGCT**
(SEC ID No. 45 Fin)V_LFin ----|NotI

GGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTC**ACATCACCATCACCATCAC**
cMyc-etiqueta His₆-etiqueta

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SKASGGTFSSYAI**SWVRQAPGQGLEWMGGI**IPI**
|-----V_H Inicio (SEC ID No.46 Inicio)

FGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARD**RERWLQ**SAG

DYWGQGTILVTVSS**KL**SGSASAPK**LEE**GEFSEARVQ**PVLTQ**SPSVSVAPGQTARI
V_H Fin- |-----Enlazador--- ---|-----V_L Inicio

TCGGNNIGSKSVHWYQ**QKPGQAPVLV**YDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTAT**LTI**

SRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISEEDLN**SHHH**
(SEC ID No. 46 Fin)V_LFin-----|

HHH

Figura 3

CCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
NcoI |-----V_H Inicio (SEC ID No.56 Inicio)

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA
ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
TGCGAAAGATCTTCCGATTACCCGCGGGACAGGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACTGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAACTTGAAGAAGGT
V_H Fin----|HindIII--Enlazador Inicio
GAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGTCTGTCTGATTACAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTC
Enlazador Fin ---- MluI---|-----V_L Inicio
TCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTATGTCTCCTGGTATCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAGACTCATGATTTACGAT
GTCACTAGTCGGCCCTCAGGGGTTTCGAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAC
GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGTT
CATATGCAGGCAGCTACAGCGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGCG
(SEC ID No. 56 Fin)V_LFin----|NotI
GCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCA
NotI cMyc-etiqueta His₆-etiqueta
CCATCAC

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
|-----V_H Inicio (SEC ID No.57 Inicio)
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLPI TRGTGA

DYWGQGTLLVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVQSVLIQPASVSGSPGQSITI
V_H Fin|-----Enlazador-----|-----V_L Inicio
SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPRLMIYDVTSRPSGVSNRFSGSKSGNTAS

LTISGLQAEDEADYYCSSYAGSYSVVFGGGTKVTVLAAAGSEQKLISEEDLN SH
(SEC ID No. 57 Fin)V_LFin-----|
HHHHH

Figura 4

CCATGGGCC**CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA**
 NcoI |-----V_H Inicio (SEC ID No.67 Inicio)

GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGT
 GCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTG
 GCACAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATC
 AGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTG
 CGCGAGGCGTAACCTGATAGCAGCTCGTCCCCGGAATCGGGGCAGGGATGCTTTTGATA
 TCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA**AAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC**
 V_H Fin-----|HindIII--Enlazador Inicio
 CCAAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGC**CACGCGTAGACATCCAGATGACCCAGTC**
 Enlazador Fin ----- MluI--|-----V_L Inicio
 TCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTC
 AGAGTATTGGTGGCTCGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAACCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGG
 ATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAACTT
 ACTACTGCCAACACTATGAAAGTTATCCCCTCTCTTTTCGGCGGCGGGACCAAGCTGGAG
 (SEC ID No. 67 Fin)V_LFin-----
ATCAAAGCGGCCGCTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACA
 -----| NotI cMyc-etiqueta
TCACCATCACCATCAC
 His₆-etiqueta

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPN
 |-----V_H Inicio (SEC ID No.68 Inicio)

SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARNLIAARPRN
 RGRDAFDIWGQGTMTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIQMTQSPSTLSAS
 V_H Fin- |-----Enlazador-----|-----V_L Inicio
 VGDRVITITCRASQSIGGSLAWYQQKPGKGPNNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG
 TEFTLTISSLQPEDSATYYCQHYESYPLSFGGGTKLEIKAAAGSEQKLISEEDL
 (SEC ID No. 68 Fin)V_LFin-----|
 NSHHHHHH

Figura 5

CCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCACCCTGGGGGGTCC
NcoI |-----V_H Inicio (SEC ID No.100 Inicio)

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATGCACTGGGT
CCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGGAGTA
GCACAAGCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
TGCGAGAAAAATCTTGGGGGTGGGAGCTAGGTCTCGTCGTTACTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAAAGCTTTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAAACTT
V_H Fin----|HindIII--Enlazador Inicio
GAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGATATTGTGCTGACCCAGACTCCAGACTC
Enlazador Fin ---- MluI--|-----V_L Inicio
CCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGACGACCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTT
TACACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCT
CCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAG
TGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATG
TGGCTTTTTACTACTGTCTGCAATATTCTACTTTTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACC
(SEC ID No. 100----
AAGGTGGAGATCAAAGCGGCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCT
-----Fin)V_LFin----| NotI cMyc-etiqueta
AAACTCACATCACCATCACCATCAC
His₆-etiqueta

QVQLQESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD
|-----V_H Inicio (SEC ID No.101 Inicio)

GSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKILGVGARSR
RYFDYWGQGTMVTVSSKLSGSASAPKLEEGEFSEARVDIVLTQTPDSLAVSLGE
V_H Fin-|-----Enlazador-----|-----V_L Inicio
TTTINCKSSQSVLHSSNNKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS
GSGTDFTLTISNLQPEDVAFYYCLQYSTFPRTFGQGTKVEIKAAAGSEQKLISE
(SEC ID No. 101 Fin)V_LFin-----|
EDLNSHHHHHH

Figura 6A

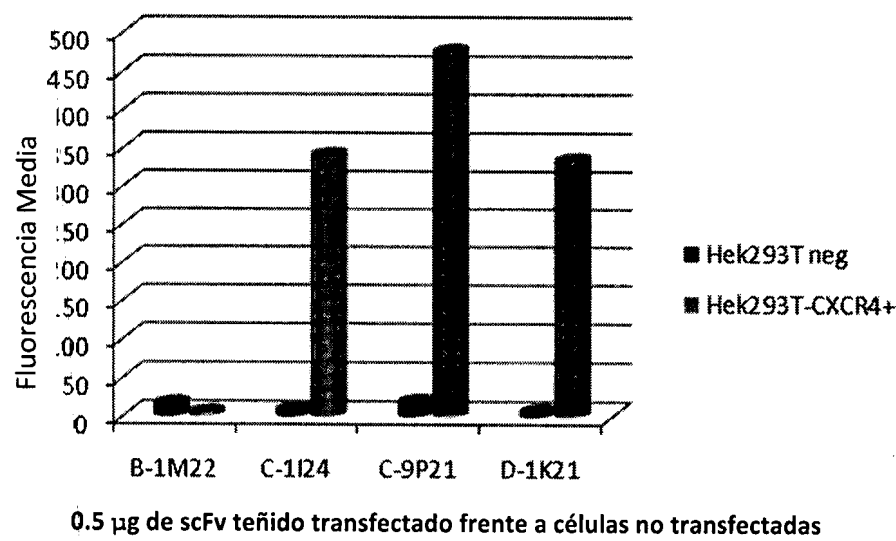
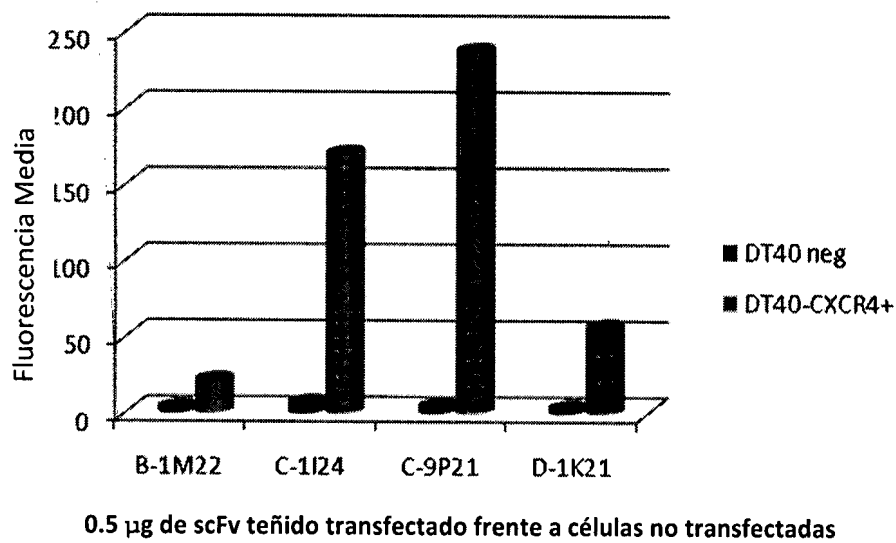
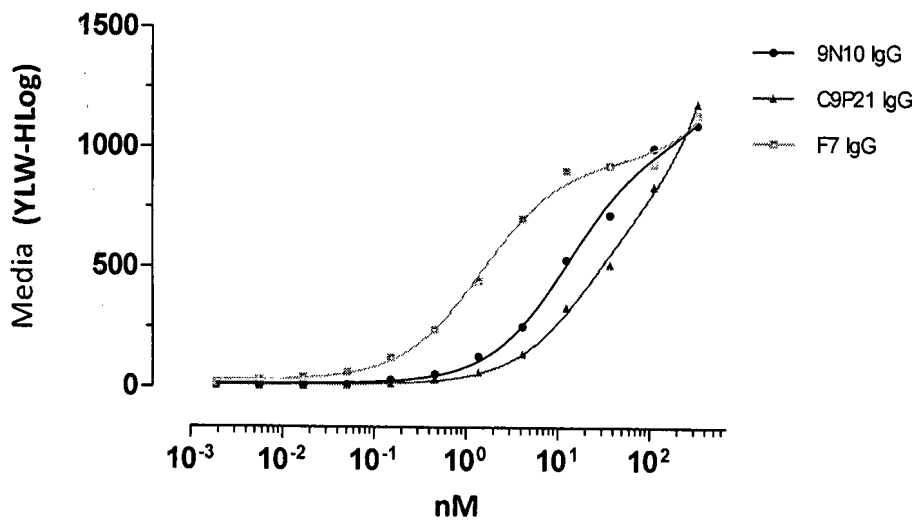
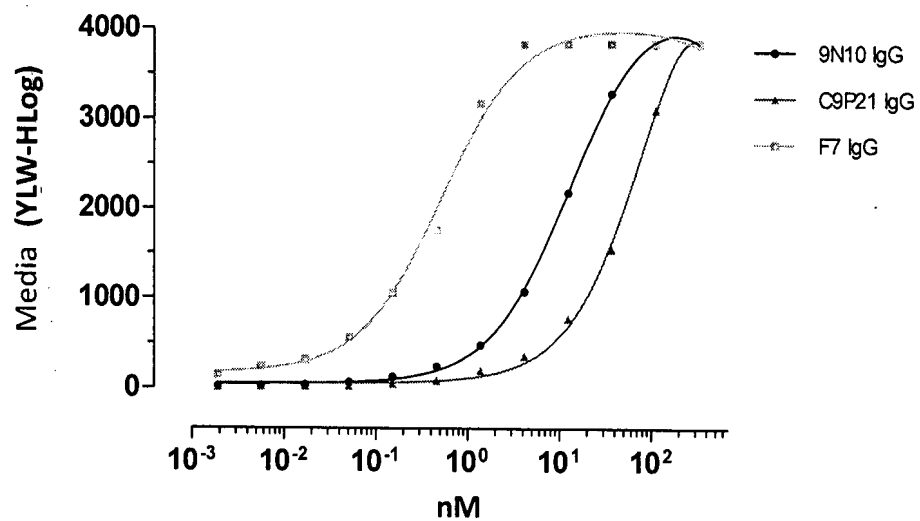


Figura 6B



7/25

Figura 6C



8/25

Figura 7A

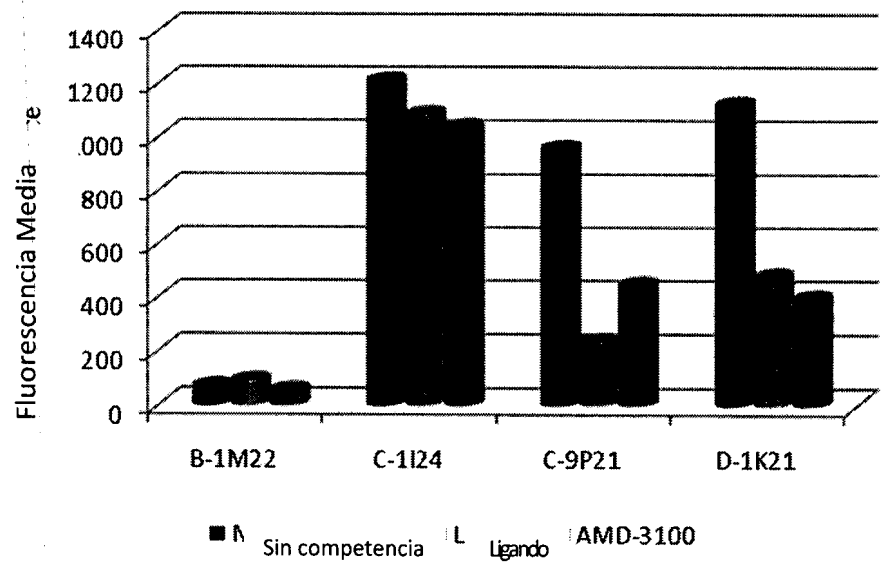
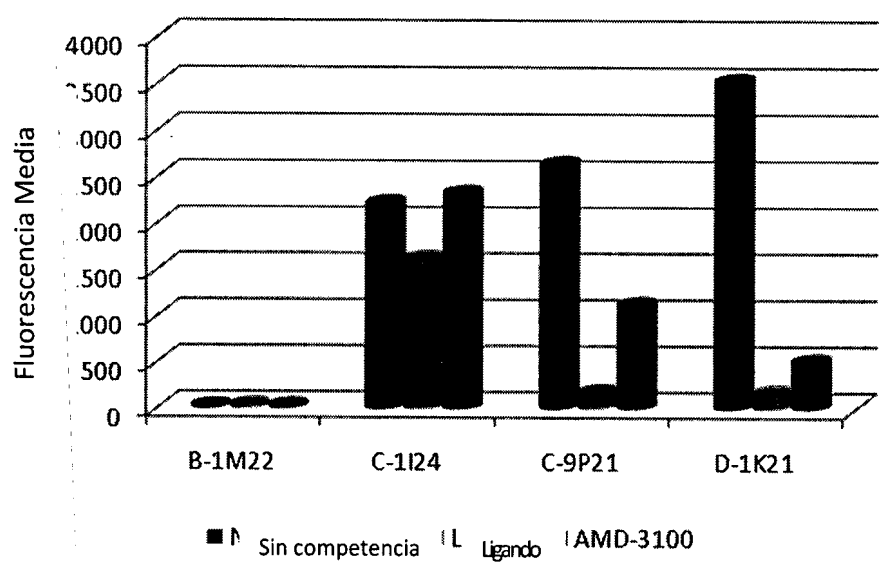
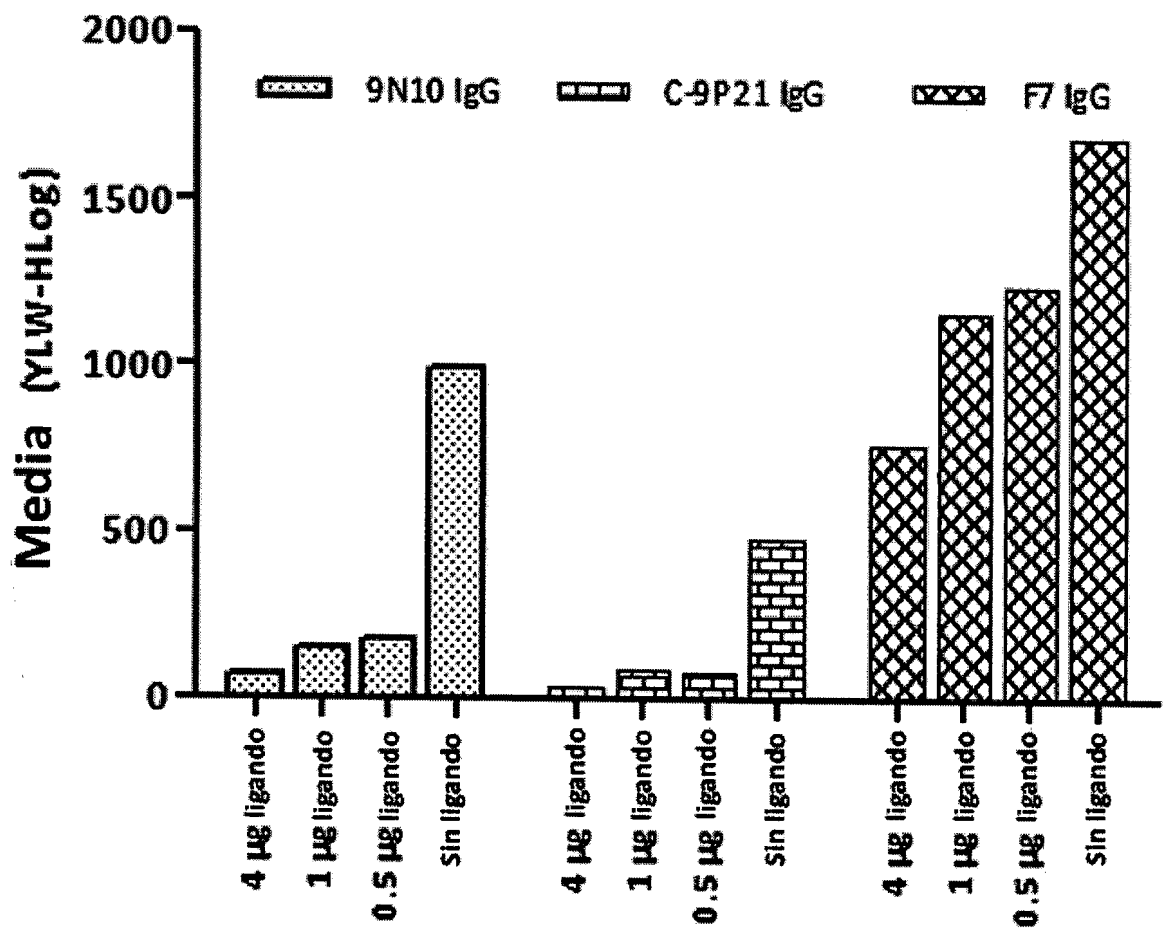


Figura 7B



9/25

Figura 7C



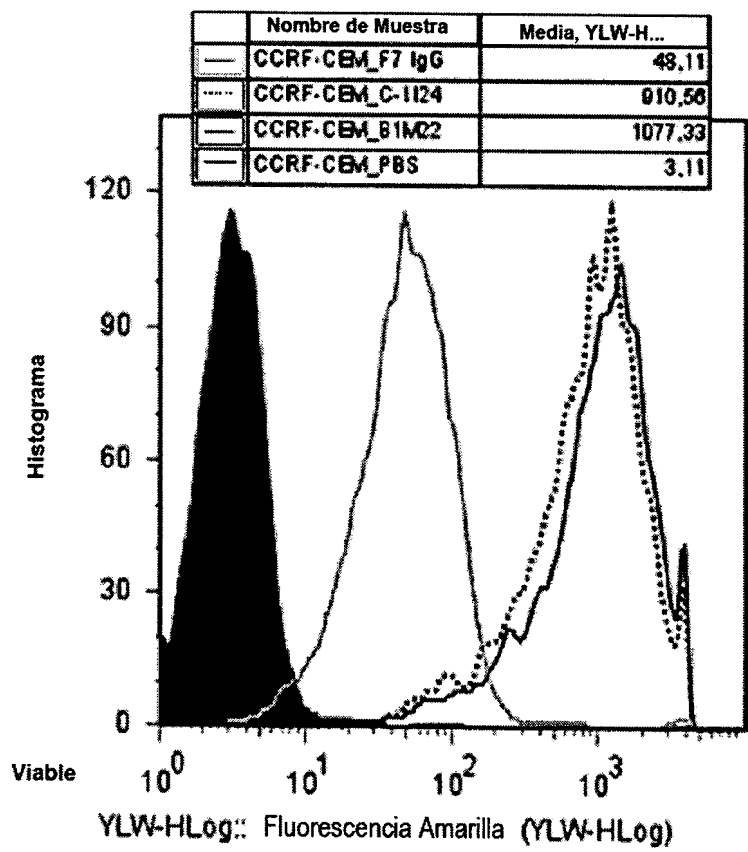


Figura 8A

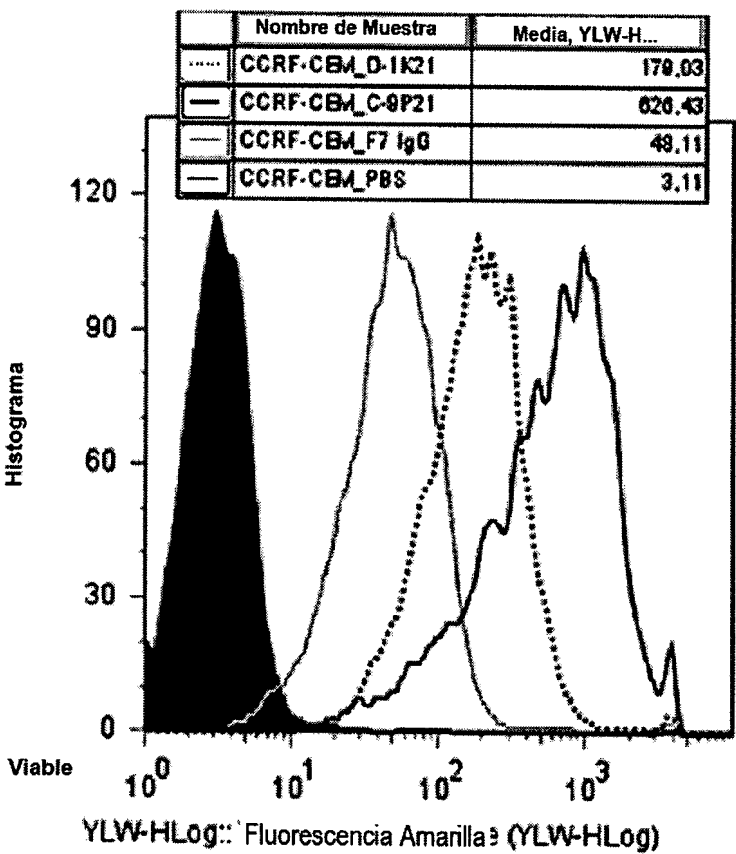
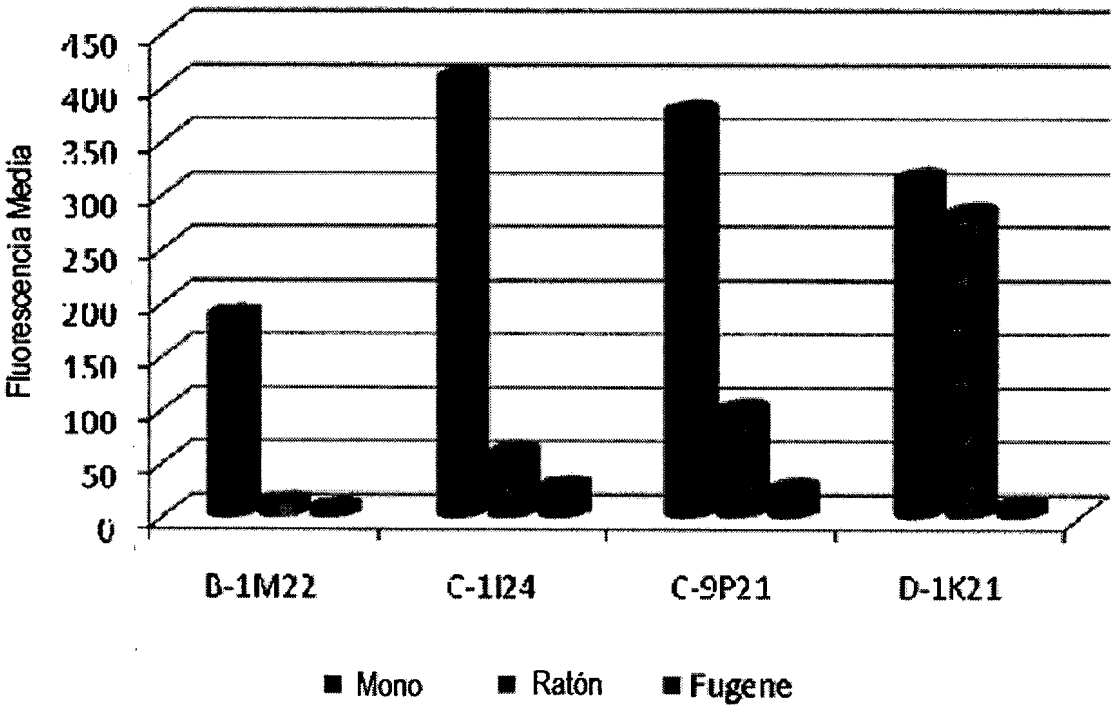


Figura 8B

11/25

Figura 9



12/25

Figura 10

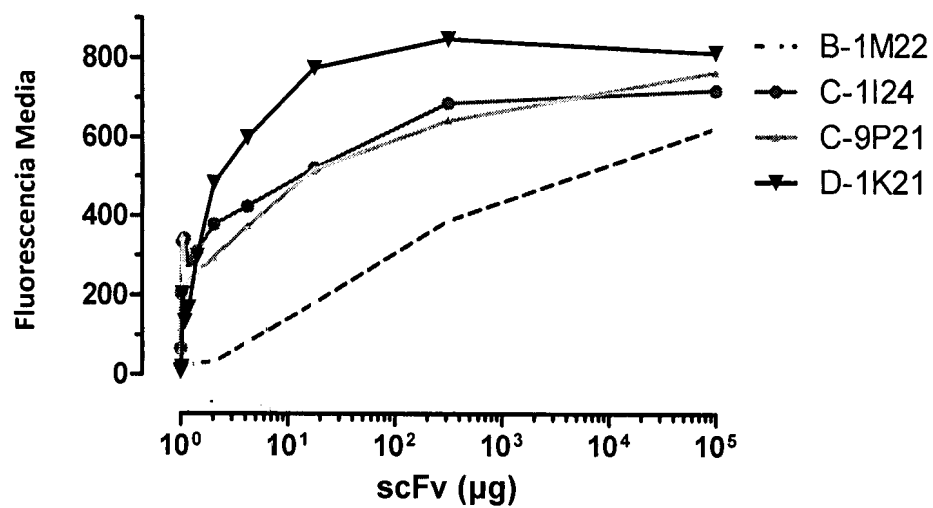


Figura 11A

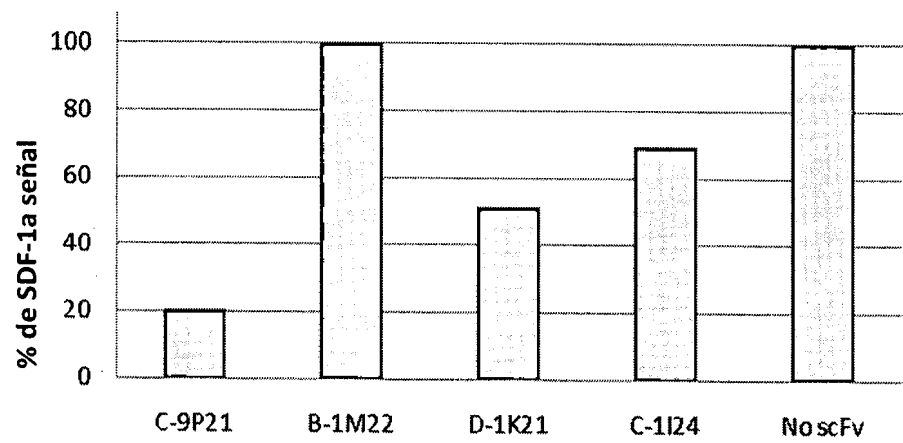


Figura 11B

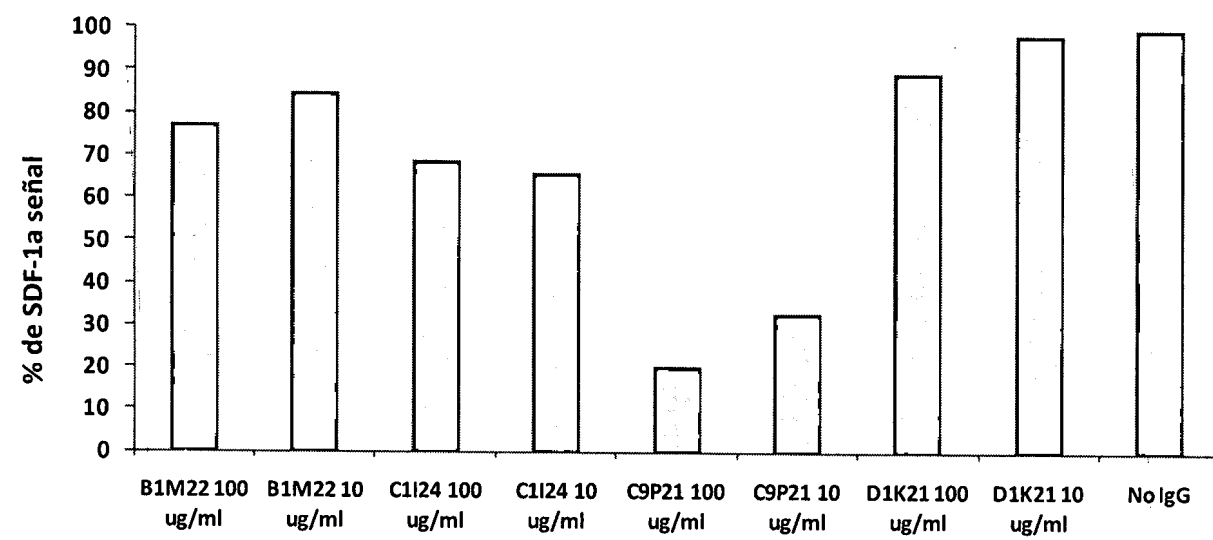


Figura 11C

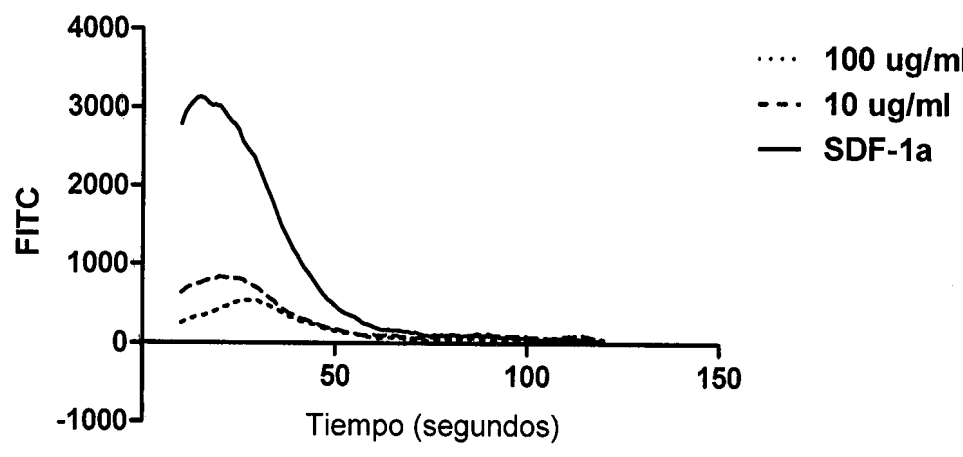
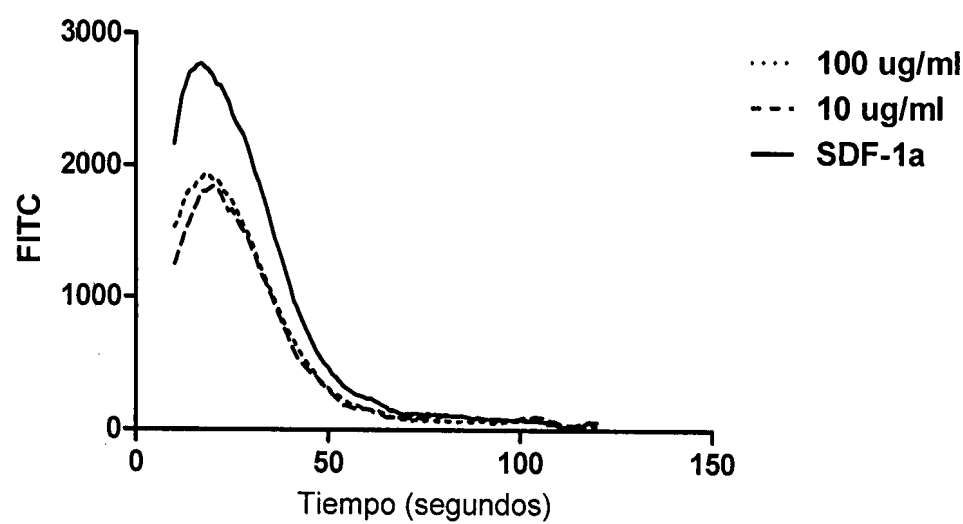


Figura 11D

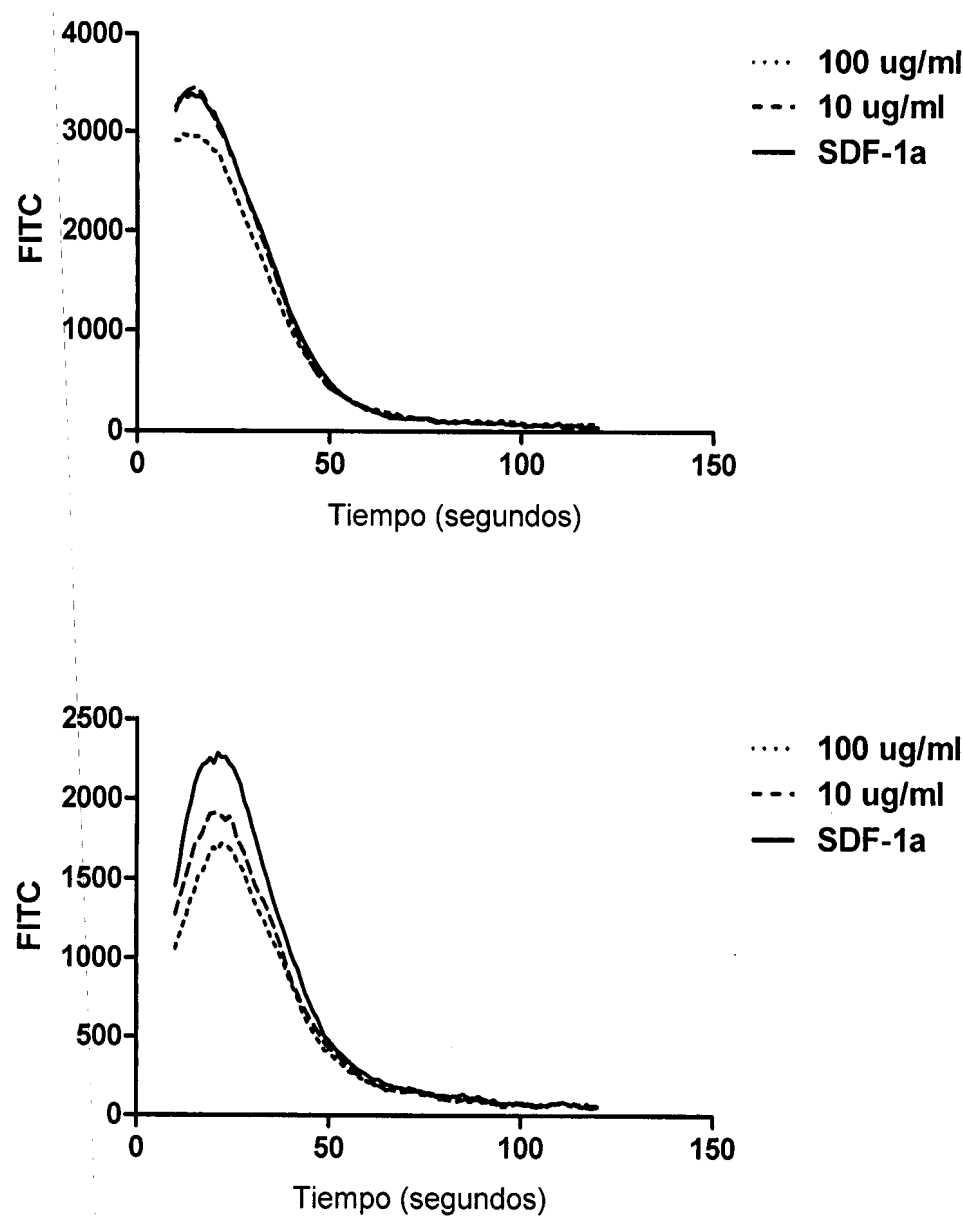


Figura 11E

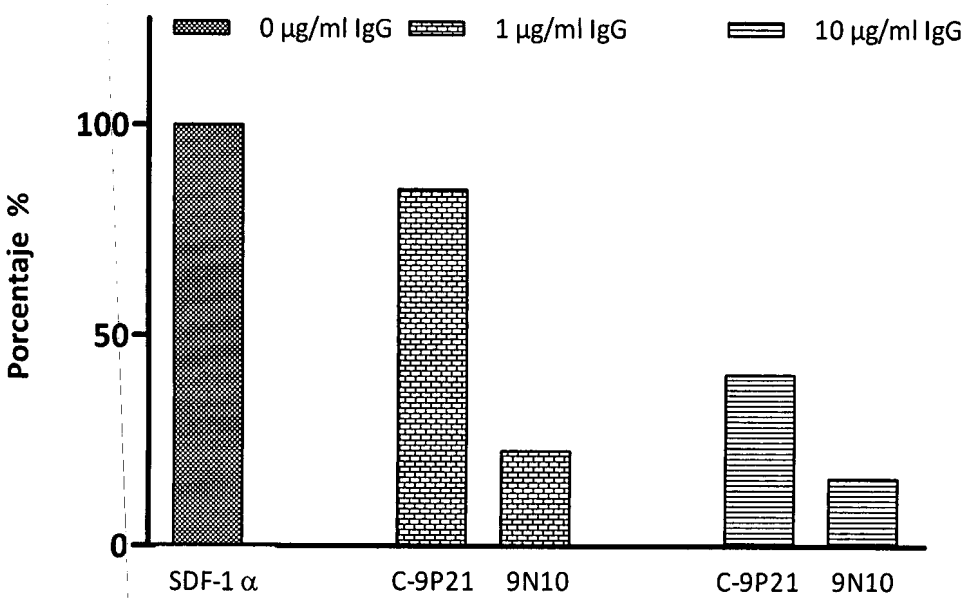


Figura 12A

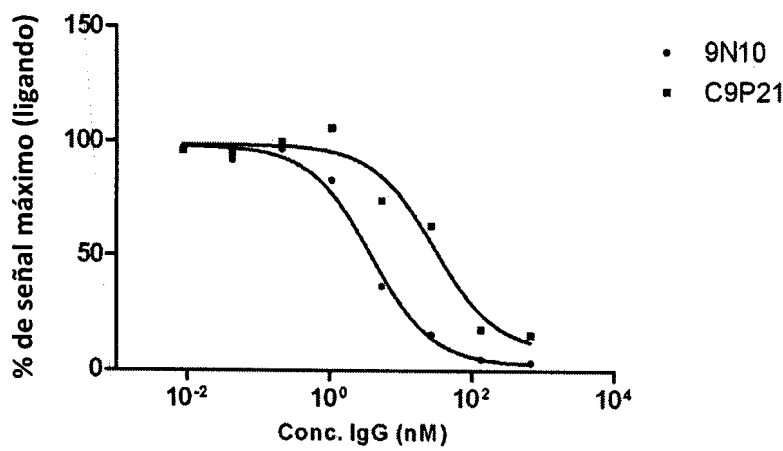


Figura 12 B

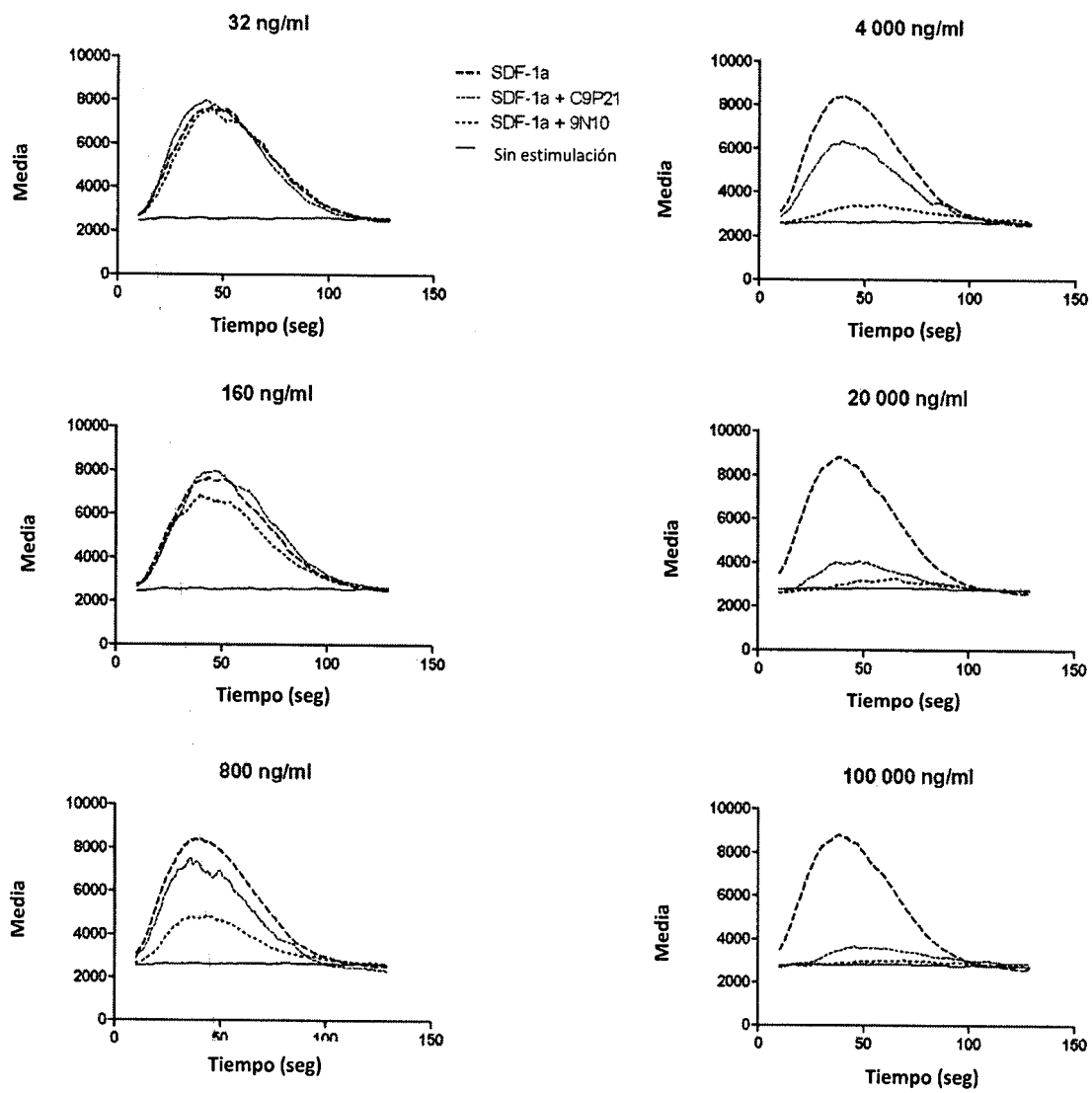


Figura 13

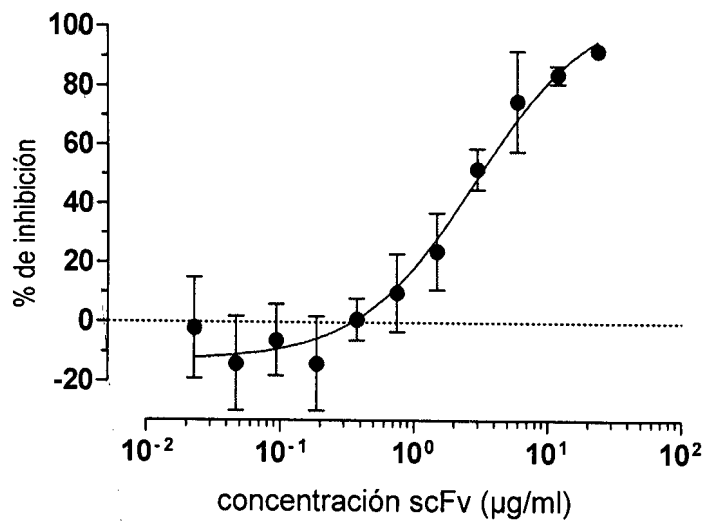


Figura 14A

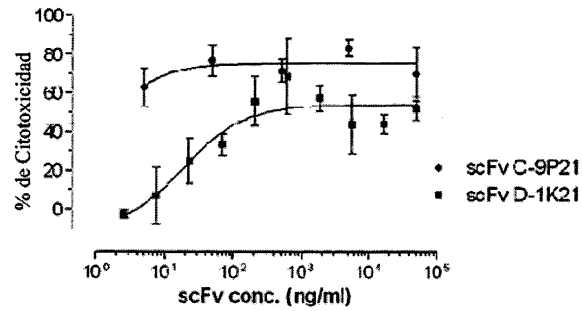


Figura 14B

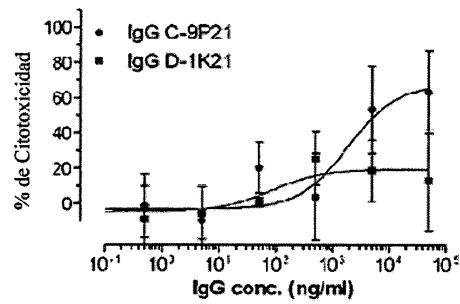


Figura 14C

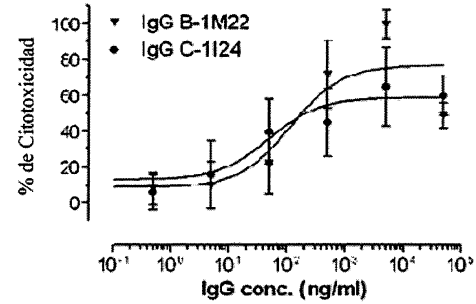


Figura 15A

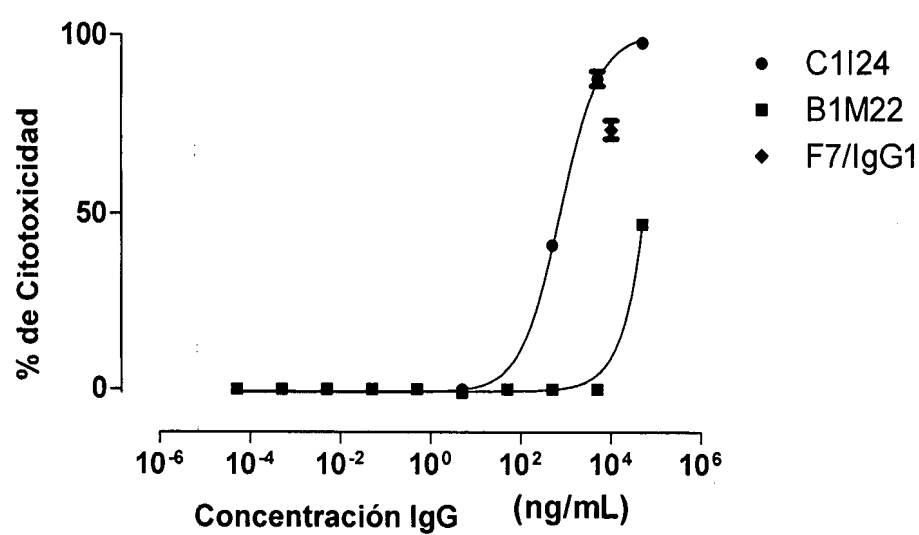


Figura 15B

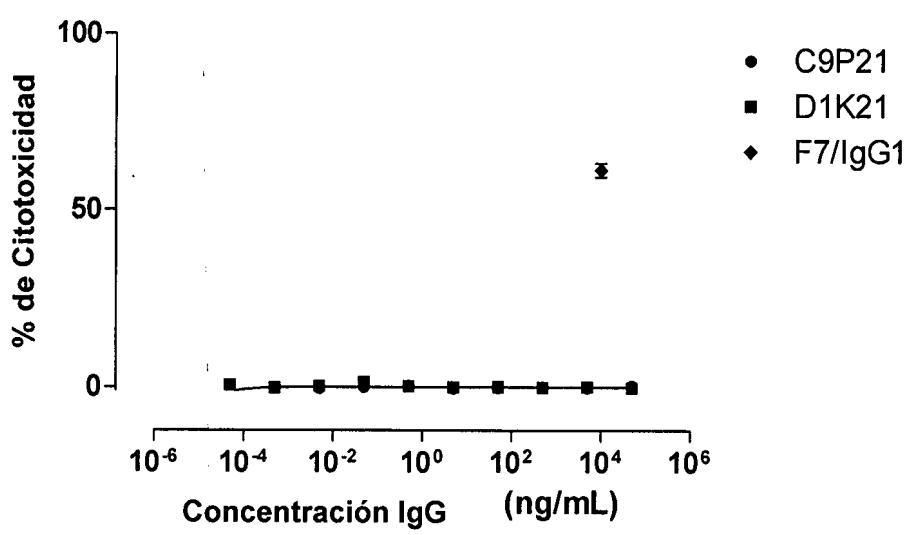


Figura 16A

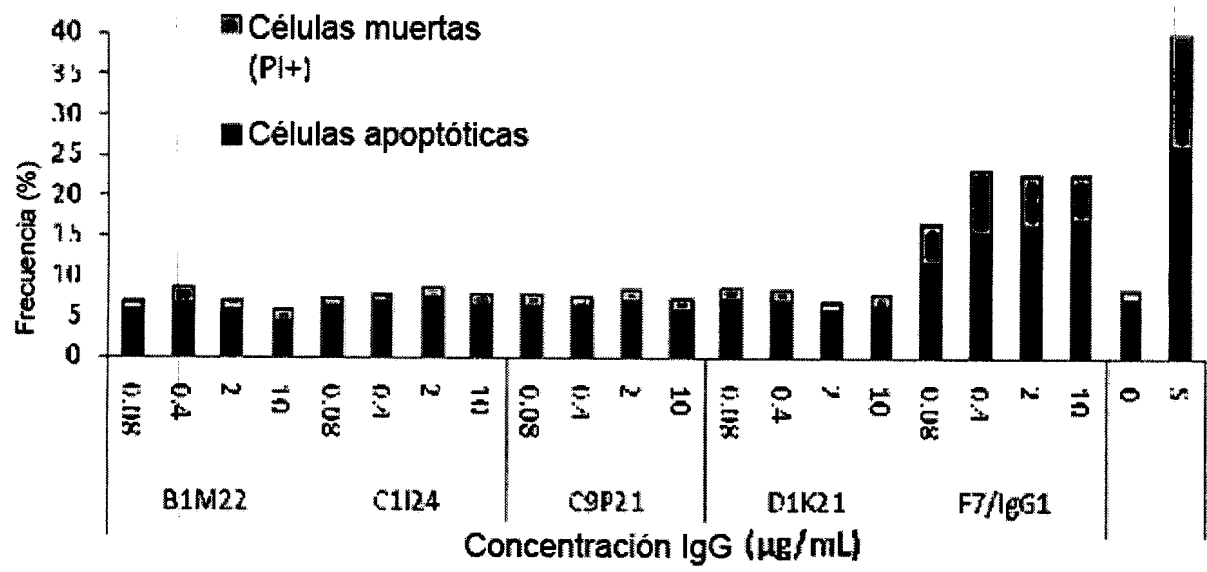
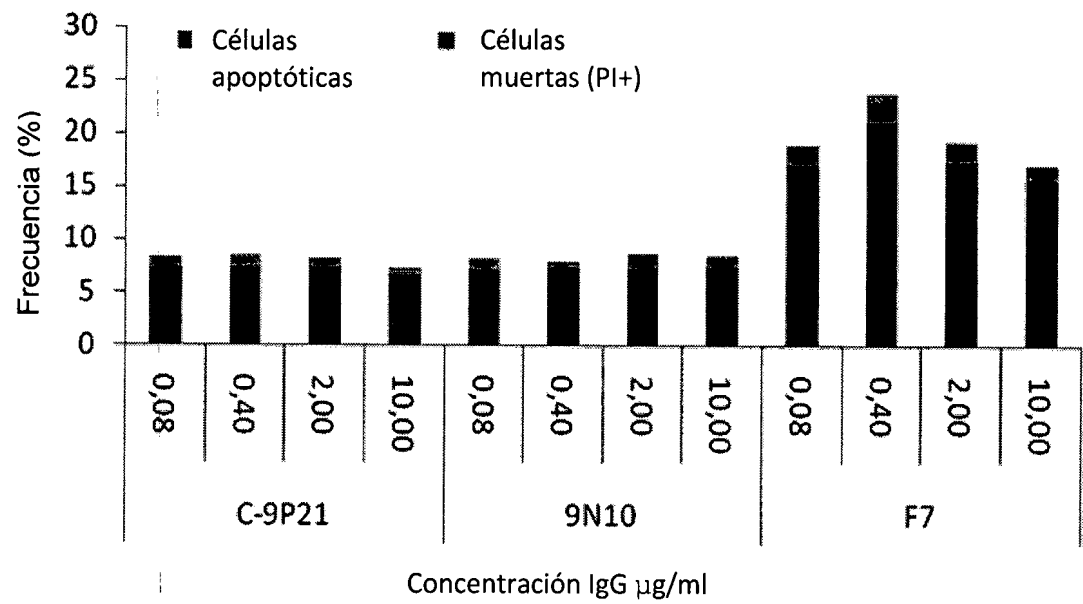


Figura 16B



RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al receptor de quimiocina CXC (4) (CXCR4) y que no inducen apoptosis significativa de células que expresan CXCR4. También se proporcionan *inter alia* inmunoconjugados y composiciones que comprenden tales anticuerpos y métodos y usos que involucran tales anticuerpos, particularmente en el campo médico y de diagnóstico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Affitech Research AS
 5 <120> Anticuerpos
 <130> 69.103698/02
 <140> PCT/GB2011/000175
 10 <141> 2011-02-10
 <150> US 61/303,060
 <151> 2010-02-10
 15 <150> GB 1002238.2
 <151> 2010-02-10
 <160> 142
 20 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30 <400> 1
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 35 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 2
 45 Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 50 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 3
 60 Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 4
 5 Arg Ala Ser Gln Ser Val Val Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 5
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 15 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 5

 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 20 1 5

 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 6
 30

 Gln Gln Phe Asp Lys Ser Thr Trp Thr
 1 5

 35 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 7

 45 Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 8
 55

 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 60 Gly

 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 9
 5 Asp Arg Glu Arg Trp Leu Gln Ser Ala Gly Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 10
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 10
 20 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30 <400> 11
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5
 35 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 12
 45 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 55 <400> 13
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 60 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 14

5 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10 <210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> secuencia de anticuerpo
<400> 15

20 Asp Leu Pro Ile Thr Arg Gly Thr Gly Ala Asp Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de anticuerpo

30 <400> 16

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

35 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> secuencia de anticuerpo
<400> 17

45 Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser
1 5

<210> 18
<211> 10
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo
55 <400> 18

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Ser Val Val
1 5 10

60 <210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> secuencia de anticuerpo
 <400> 19
 5 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5
 <210> 20
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 15 <400> 20
 Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 20 Gly
 <210> 21
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30 <400> 21
 Arg Asn Leu Ile Ala Ala Arg Pro Arg Asn Arg Gly Arg Asp Ala Phe
 1 5 10 15
 35 Asp Ile
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 45 <400> 22
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser Leu Ala
 1 5 10
 50 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 23
 60 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 5 <400> 24
 Gln His Tyr Glu Ser Tyr Pro Leu Ser
 1 5
 10 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 25
 20 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 25
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 35 <400> 26
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
 1 5 10
 40 <210> 27
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 27
 50 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 55
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 65 <400> 28

202
205

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

5 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 29

15 Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Arg Val
 20

20 <210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 30

30 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

35 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 31

45 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ser
 1 5 10 15

50 <210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

55 <400> 32

60 Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

65 <210> 33
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 33

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 10 1 5 10

 <210> 34
 <211> 759
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 20 <400> 34
 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120
 25 ccagggaagg ggctggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaagctac 180
 gcggaactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300
 30 ttgggggttg gagctaggtc tcgtcgttac tttagactact ggggccaggg aacaatggtc 360
 accgtctctt caaagctttc agggagtgc tccgccccaa aacttgaaga aggtgaattt 420
 35 tcagaagcac gcgtagaaac gacactcacg cagtctccag gcacctgtc tttgtctcca 480
 ggggaaagag ccacctctc ctgcagggcc agtcagagtg ttgtcagcaa ctatttagcc 540
 tgggtaccagc agaagcctgg ccaggctccc aggtctctca tctctggtgc atccaacagg 600
 40 gccactggca tctcagacag gttcagtggc agtgggtctg gggcagactt cactctcacc 660
 atcagcagag tcgagcctga agactcagca gtgtattact gtcaacagtt tgataagtcc 720
 45 acgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaa 759

 <210> 35
 <211> 253
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 55 <400> 35

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

 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 65 35 40 45

207

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly
 115 120 125
 15 Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 130 135 140
 20 Val Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 145 150 155 160
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Val Ser
 165 170 175
 25 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 180 185 190
 Leu Ile Ser Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe
 195 200 205
 30 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
 210 215 220
 Glu Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 35 Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 245 250
 40 <210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 36
 50 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
 20 25 30
 55 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 37
 65 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 38
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 10 <400> 38

 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

 15 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 39
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 25 <400> 39

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 30 <210> 40
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 40

 40 Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
 1 5 10 15

 Ser Glu Ala Arg Val
 45 20

 <210> 41
 <211> 22
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 55 <400> 41

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

 60 Thr Ala Arg Ile Thr Cys
 20

 <210> 42
 <211> 15
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

5 <400> 42

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 43

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 <210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 44

35

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 45

40 <211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 45

cagggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

50 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

55 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300

gagagatggc tacaatccgc gggcgactac tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360

60 tcaaagcttt cagggagtgc atccgcccc aaacttgaag aaggtgaatt ttcagaagca 420

cgcgtagacg ctgtgctgac tcagtcaccc tcggtgtcag tggccccagg acagacggcc 480

65 aggattacct gtgggggaaa caacattgga agtaaaagtg tgcactggta ccagcagaag 540

ccaggccagg cccctgtgct ggtcgtctat gatgatagcg accggccctc agggatccct 600

gagcgatttbt ctgggtccaa ctctgggaac acggccaccc tgaccatcag cagggtcgaa 660
 gccggggatg aggccgacta ttactgtcag gtgtggggata gtagtagtga tcattgggtg 720
 5 ttcgggcggag ggaccaagct gaccgtccta 750

 <210> 46
 <211> 250
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 15 <400> 46

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 25 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 30 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Asp Arg Glu Arg Trp Leu Gln Ser Ala Gly Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser
 115 120 125
 40 Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Pro
 130 135 140
 45 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
 145 150 155 160
 Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
 165 170 175
 50 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
 180 185 190
 Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 195 200 205
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
 210 215 220
 60 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 225 230 235 240
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 245 250
 65 <210> 47
 <211> 30

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 47

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

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

 15 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 48

 25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 49
 <211> 32
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 35 <400> 49

 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 40 1 5 10 15

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

 <210> 50
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 50

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 55 1 5 10

 <210> 51
 <211> 21
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 65 <400> 51

209
212

Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Arg Val
 5 20
 <210> 52
 <211> 22
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 15 <400> 52
 Gln Ser Val Leu Ile Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 20 Ser Ile Thr Ile Ser Cys
 20
 <210> 53
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30 <400> 53
 Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Met Ile Tyr
 1 5 10 15
 35 <210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 54
 45 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 50 20 25 30
 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 60 <400> 55
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10
 65 <210> 56
 <211> 756

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 56

cagggtccagc tgggtacagtc tgggggaggc gtggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60
 10 tctgtgtcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
 15 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatctt 300
 ccgattaccg gcgggacagg ggctgactac tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
 20 tcaaagcttt cagggagtgc atccgcccc aacttgaag aagggtgaatt ttcagaagca 420
 cgcgtacagt ctgtcctgat tcagcctgcc tccgtgtctg ggtctcctgg acagtcgatc 480
 accatctcct gcaactggaac cagcagtgc gttggtgggt ataactatgt ctctgtgtat 540
 25 caacaacacc caggcaaagc cccagactc atgatttacg atgtcactag tcggccctca 600
 ggggtttcga atcgtttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccatctct 660
 30 gggctccagg ctgaggacga ggctgattat tactgcagtt catatgcagg cagctacagc 720
 gtggtattcg gcggaggggac caaggtcacc gtccta 756

<210> 57

35 <211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 57

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

Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser
130 135 140

5 Val Leu Ile Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile
145 150 155 160

Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
165 170 175

10 Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Met Ile
180 185 190

Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
15 195 200 205

Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala
210 215 220

20 Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Ser
225 230 235 240

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
245 250

25 <210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 58

35 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

40 <210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 59

50 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

55 <210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 60

65 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

5 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 61

15 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

20 <210> 62
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

25 <400> 62

Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
 1 5 10 15

30 Ser Glu Ala Arg Val
 20

35 <210> 63
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

40 <400> 63

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

50 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 64

60 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro Asn Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

65 <210> 65
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 65

5 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

10 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

20 <400> 66

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

25 <210> 67
<211> 765
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 67

35 caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atcaacccta acagtgggtg cacaactat 180

40 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgcgc gaggcgtaac 300
ctgatagcag ctcgctccccg gaatcggggc agggatgctt ttgatatctg gggccaaggg 360

45 acaatgggtca ccgtctcttc aaagctttca gggagtgcac ccgccccaaa acttgaagaa 420
ggtgaatttt cagaagcacg cgtagacatc cagatgaccc agtctccttc caccctgtct 480

50 gcatctgtag gagacagagt caccatcact tgccggggcca gtcagagtat tgggtggctcg 540
ttggcctggt atcagcagaa accagggaaa ggcctaacc tcctgatcta tgctgcatcc 600

55 actttgcaaa gtgggggtccc atcaagggtc agcggcagtg gatctgggac agaattcact 660
ctcacaatca gcagcctgca gcctgaagat tctgcaactt actactgcca acactatgaa 720
agttatcccc tctcttttcgg cggcgggacc aagctggaga tcaaa 765

60 <210> 68
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

214
217

<400> 68

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

10 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

15 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Leu Ile Ala Ala Arg Pro Arg Asn Arg Gly Arg Asp
100 105 110

25 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Lys
115 120 125

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

30 Glu Ala Arg Val Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
145 150 155 160

35 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
165 170 175

Ile Gly Gly Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro
180 185 190

40 Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
210 215 220

45 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Glu
225 230 235 240

Ser Tyr Pro Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250 255

<210> 69

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 69

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 15 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20 <210> 70
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 70
 30 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Val Ser Asn
 20 25 30
 35 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 40 Ile Ser Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu
 65 70 75 80
 45 Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Ser Thr
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 50 <210> 71
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 71
 60 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 65 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

216
219

35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 5
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 10 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Glu Arg Trp Leu Gln Ser Ala Gly Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 72
 <211> 108
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 25 <400> 72
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 30 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 35 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 40 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 45 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 73
 <211> 121
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 55 <400> 73
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 60 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 65 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

10 Ala Lys Asp Leu Pro Ile Thr Arg Gly Thr Gly Ala Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 74
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 74

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

30 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu
35 40 45

35 Met Ile Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

40 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

45 <210> 75
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 75

55 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

60 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

65 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asn Leu Ile Ala Ala Arg Pro Arg Asn Arg Gly Arg Asp
100 105 110

10 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 76
15 <211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> secuencia de anticuerpo
<400> 76

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
25 1 5 10 15

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

30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

40 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Glu Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

45 <210> 77
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> secuencia de anticuerpo
<400> 77

55 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaagctac 180

60 gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300
ttgggggtgg gagctaggtc tcgtcggttac tttgactact ggggccaggg aacaatggtc 360

65 accgtctctt ca 372

<210> 78
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 78
 10 gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttgct agcaactatt tagcctggta ccagcagaag 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcca acagggccac tggcatctca 180
 15 gacaggttca gtggcagtgg gtctggggca gacttcactc tcaccatcag cagagtcgag 240
 cctgaagact cagcagtgtg ttactgtcaa cagtttgata agtccacgtg gacgttcggc 300
 20 caagggacca aggtggaaat caaa 324
 <210> 79
 <211> 363
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30
 <400> 79
 caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 35 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgoggacg aatccacgag cacagcctac 240
 40 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
 gagagatggc tacaatccgc gggcgactac tggggccagg gaacctggt cactgtctcc 360
 tca 363
 45
 <210> 80
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 80
 55 cagcctgtgc tgactcagtc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccttg tgctggctgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 60 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtgttcggc 300
 65 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 81
 10 caggtccagc tggtagagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
 15 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatcctt 300
 20 ccgattaccc gggggacagg ggctgactac tggggccagg gaaccctggg cactgtctcc 360
 tca 363
 25 <210> 82
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 82
 35 cagtctgtcc tgattcagcc tgctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtatcaacaa 120
 caccagggca aagccccag actcatgatt tacgatgtca ctagtcggcc ctcaggggtt 180
 40 tcgaatcgct tctctggctc caagtctggc aacaoggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
 caggtgagg acgaggctga ttattactgc agttcatatg caggcagcta cagcgtggta 300
 ttcgggggag ggaccaaggt caccgtccta 330
 45 <210> 83
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 83
 55 caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atcaacccta acagtgggtg caciaactat 180
 60 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgcgc gaggcgtaac 300
 ctgatagcag ctgctccccg gaatcggggc agggatgctt ttgatatctg gggccaaggg 360
 65 acaatggtca ccgtctcttc a 381

221
224

<210> 84
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 10 <400> 84
 gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattggt ggctcggtgg cctgggtatca gcagaaacca 120
 15 gggaaaggcc ctaacctoct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattctg caacttacta ctgccaacac tatgaaagtt atccccctctc tttcggcggc 300
 20 gggaccaagc tggagatcaa a 321

 <210> 85
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 30
 <400> 85

 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 35
 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 86
 45
 Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 50
 <210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 87
 60
 Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

 <210> 88
 65 <211> 17
 <212> PRT

22
225

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 5 <400> 88
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 10 Ala
 <210> 89
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 20 <400> 89
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 25 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 90
 35 Leu Gln Tyr Ser Thr Phe Pro Arg Thr
 1 5
 40 <210> 91
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 91
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 50 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 55 <210> 92
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 92
 65 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 93
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 10 <400> 93
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 15 20 25 30

 <210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 25 <400> 94

 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 30 <210> 95
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 95

 40 Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Arg Val
 20
 45
 <210> 96
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 96
 55
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Thr Thr Ile Asn Cys
 60 20

 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

274
228

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 97
 5 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 98
 10 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 98
 20 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 25 <210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 99
 35 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 100
 <211> 774
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 45 <400> 100
 cagggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgtcag cctctggatt caccttcagt agtactgga tgcaactgggt ccgccaagct 120
 50 ccaggaagg ggctggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaagctac 180
 gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 55 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300
 ttgggggtgg gagctaggtc tcgtcgttac tttgactact ggggccaggg aacaatggtc 360
 accgtctctt caaagctttc agggagtgc tccgccccaa aacttgaaga aggtgaattt 420
 60 tcagaagcac gcgtagatat tgtgctgacc cagactccag actccctggc tgtgtctctg 480
 ggcgagacga ccaccatcaa ctgcaagtcc agccagagtg ttttacacag ctccaacaat 540
 65 aagaactact tagcttggtg ccagcagaaa ccaggacagc ctctaagct gctcatttac 600

tgggcatcta cccggaatc cggggtccct gaccgattca gtggcagcgg gtctgggaca 660
 gatttcactc tcaccatcag caacctgcag cctgaagatg tggtttttta ctactgtctg 720
 5 caatattcta cttttcctcg gacgttcggc caagggacca aggtggagat caaa 774

 <210> 101
 <211> 258
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 15 <400> 101

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

<210> 102
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 102
 10 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45
 20 Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 35 <210> 103
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 103
 45 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Thr Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser
 20 25 30
 50 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 55 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 60 Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95
 Tyr Ser Thr Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 65 Lys

<210> 104
 <211> 372
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 10 <400> 104
 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120
 15 ccaggaagg ggctgggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaagctac 180
 gcggaactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300
 20 ttgggggtgg gagctaggtc tcgtcgttac tttgactact ggggccaggg aacaatggtc 360
 accgtctctt ca 372

 25 <210> 105
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 105
 35 gatattgtgc tgaccagac tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gacgaccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta cacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 40 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcaacc tgcagcctga agatgtggct tttactact gtctgcaata ttctactttt 300
 cctcggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gagatcaaa 339
 45
 <210> 106
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 106
 55 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120
 ccaggaagg ggctgggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaagctac 180
 60 gcggaactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300
 65 ttgggggtgg gagctaggtc tcgtcgttac tttgactact ggggccaggg aacaatggtc 360

accgtctctt cagcctccac caagggccca tgggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420
 agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctgtca aggactactt ccccgaaaccg 480
 5 gtgacgggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc 540
 ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
 10 ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
 aaagttgagc ccaaattctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720
 ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 780
 15 tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
 20 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg 960
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
 25 tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat 1140
 cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
 30 acgcctcccg tgctggactc cgaaggctcc ttctctctct acagcaagct caccgtggac 1260
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1362
 35 <210> 107
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 107
 45 gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagtc gagtggtgtc agcaactatt tagcctggta ccagcagaag 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcca acagggccac tggcatctca 180
 50 gacaggttca gtggcagtg gtctggggca gacttcaact tcaccatcag cagagtcgag 240
 cctgaagact cagcagtgtt ttactgtcaa cagtttgata agtccacgtg gacgttcggc 300
 55 caagggacca aggtggaaat caaacgaact gtgggtgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 60 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt ccccatcag 600
 65 ggctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645
 <210> 108

<211> 454
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 108

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

15 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

25 Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

30 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

35 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

40 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

50 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

55 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

60 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

65 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 5 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 10 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 15 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 20 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 25 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 30 <210> 109
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 109
 40 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Val Ser Asn
 20 25 30
 45 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 50 Ile Ser Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu
 65 70 75 80
 55 Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Ser Thr
 85 90 95
 60 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 65 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

5 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

10 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
15 210 215

<210> 110
<211> 1353
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

25 <400> 110
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

30 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatoccta tcttttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcgagc aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300

35 gagagatggc tacaatccgc gggcgactac tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

40 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

45 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780

50 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900

55 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccccc atcccgggat 1080

60 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200

65 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

5

<210> 111

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 111

15 cagcctgtgc tgactcagtc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120

caggccccctg tgctggctgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat cctgagcga 180

20

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtgttcggc 300

25

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcgggt cactctgttc 360

ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgc 420

ttctaccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 480

30

gtggagacca ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcgccag cagctatctg 540

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cagcatgaa 600

35

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatgtt ca 642

<210> 112

<211> 451

40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

45

<400> 112

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

50

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

55

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

65

Ala Arg Asp Arg Glu Arg Trp Leu Gln Ser Ala Gly Asp Tyr Trp Gly

	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120	125
5	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130	135	140
10	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145	150	155
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170	175
15	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185	190
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200	205
20	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215	220
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
	225	230	235
25	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	245	250	255
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	260	265	270
30	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	275	280	285
35	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295	300
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	305	310	315
40	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	325	330	335
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	340	345	350
45	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	355	360	365
50	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	370	375	380
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	385	390	395
55	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	405	410	415
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	420	425	430
60	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	435	440	445
65	Pro Gly Lys		
	450		

<210> 113
 <211> 214
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 10 <400> 113

 Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 15 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 20 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 25 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 30 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 35 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 40 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 45 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 50 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210
 55 <210> 114
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

 <400> 114
 cagggtccagc tgggtacagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 65 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

5 ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatctt 300

ccgattaccc gcgggacagg ggctgactac tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360

10 tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

15 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

20 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tottctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780

cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

25 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

30 aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

35 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

40 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

45 <210> 115
<211> 648
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 115
cagtctgtcc tgattcagcc tgccctcgtg totgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

55 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtatcaacaa 120

caccagga aagccccag actcatgatt tacgatgtca ctagtcggcc ctgaggggtt 180

60 tcgaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agttcatatg caggcagcta cagcgtggta 300

ttcggcgag ggaccaaggc caccgtcta ggtcagccca aggtgcccc ctcggtcact 360

65 ctgttccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata 420

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 480
 gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540
 5 tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600
 catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca 648

10 <210> 116
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 116

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 5 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 10 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 15 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 20 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 25 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 30 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 35 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 40 <210> 117
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 117
 50 Gln Ser Val Leu Ile Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 55 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 60 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 65 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 5 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 10 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 15 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 20 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 25 <210> 118
 <211> 1371
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 118
 cagggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 35 tctctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggacgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
 40 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgcgc gaggcgtaac 300
 ctgatagcag ctcgctccccg gaatcggggc agggatgctt ttgatatctg gggccaaggg 360
 45 acaatgggtca cegtctcttc agcctccacc aagggcccat cggctcttccc cctggcaccc 420
 tcttccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 480
 cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc 540
 50 ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc 600
 agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag 660
 55 gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccc 720
 gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 780
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac 840
 60 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag 900
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgggtca gcgtctcac cgtcctgcac 960
 65 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1020

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1080
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1140
 5 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1200
 tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc 1260
 accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1320
 10 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1371

<210> 119
 15 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 119
 gacatccaga tgaccagtc tocttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 25 atcaattgcc gggccagtc gagtattggg ggctcgttgg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaggcc ctaacctcct gatctatgct gcattccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 30 gaagattctg caacttacta ctgccaacac tatgaaagtt atccccctctc ttctggcggc 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 35 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 40 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

45 <210> 120
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 120
 55 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 60 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 65 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 5 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Arg Asn Leu Ile Ala Ala Arg Pro Arg Asn Arg Gly Arg Asp
 100 105 110
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 15 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 20 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 25 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 30 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220
 35 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 40 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285
 45 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300
 50 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335
 55 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365
 60 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400
 65 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430
 5 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 10 <210> 121
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 121
 20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 30 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 35 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Glu Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 40 Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 45 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 50 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 55 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 60 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 65 <210> 122
 <211> 1362
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

5

<400> 122

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcacc ctgggggggc cctgagactc 60

10

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120

ccaggaagg ggctgggtgt ggtctcacgt attaatagt atgggagtag cacaagctac 180

gcgactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240

15

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaaaatc 300

ttgggggtgg gagctaggtc tcgtcgttac ttgactact gggggccaggg aacaatggtc 360

20

accgtctctt cagcctccac caagggccca tcggctcttc ccctggcacc ctccctcaag 420

agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt ccccgaaaccg 480

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540

25

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggta ccgtgcctc cagcagcttg 600

ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660

30

aaagttgagc ccaaattctg tgacaaaact cacacatgcc caccggtccc agcacctgaa 720

ctcctggggg gaccgtcagt ctccctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 780

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840

35

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960

40

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat 1140

45

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1260

50

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1362

<210> 123

<211> 660

55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

60

<400> 123

gatattgtgc tgaccagac tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gacgaccacc 60

65

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta cacagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtca ttactgggc atctaccogg 180

243
246

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcaacc tgcagcctga agatgtggct ttttactact gtctgcaata ttctactttt 300
 5 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gagatcaaac gaactgtggc tgcaccatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 10 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctgagcagca ccttgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 15 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 <210> 124
 <211> 454
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 25 <400> 124
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 50 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 55 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 60 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 65 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 5 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 10 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 15 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 20 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 25 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 30 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 35 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 40 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 125
 50 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 125
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 60 1 5 10 15
 Glu Thr Thr Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser
 20 25 30
 65 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Cys Leu Gln
85 90 95

10 Tyr Ser Thr Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

15 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

20 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
25 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

30 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

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

35 <210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<220>

45 <221> Xaa
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser S o G

<220>

50 <221> Xaa
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o W o Y o A,
most
preferiblemente W

55 <220>
<221> Xaa
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser M o I

60 <220>
<221> Xaa
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser H o S

65 <400> 126

Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5

- 5 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
- <220>
 <221> Xaa
- 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser S o G, preferiblemente S
- <220>
 <221> Xaa
- 20 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o W o Y o A, most
 preferiblemente W.
- 25 <400> 127
- Xaa Tyr Xaa Met His
1 5
- 30 <210> 128
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
- <220>
 <221> Xaa
- 40 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido, preferiblemente G o W o Y o A, most
 preferiblemente W
- 45 <400> 128
- Ser Tyr Xaa Met His
1 5
- 50 <210> 129
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
- <220>
 <221> Xaa
- 60 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- <220>
 <221> Xaa
- 65 <222> (3)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <220>
 <221> Xaa
 5 <222> (8)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 <400> 129
 10 Xaa Ile Xaa Xaa Asp Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15 <210> 130
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <220>
 <221> Xaa
 25 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser V o R
 <220>
 <221> Xaa
 30 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser S o N
 <220>
 <221> Xaa
 35 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Y o S
 <220>
 <221> Xaa
 40 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser N o S
 <220>
 <221> Xaa
 45 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser K o T
 <220>
 <221> Xaa
 50 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser Y o S
 <400> 130
 55 Xaa Ile Xaa Xaa Asp Gly Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 60 <210> 131
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<220>
 <221> Xaa
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(6)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> Xaa
 <222> (8)..(9)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <400> 131

 Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 25 1 5 10 15

 Gly

 <210> 132
 30 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> secuencia de anticuerpo

 <220>
 <221> Xaa
 <222> (1)..(1)
 40 <223> Xaa puede ser Ror G
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser N o I
 45
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser N o I
 50
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser S o F
 55
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser G o T
 60
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser T o A
 65
 <400> 132

341
252

Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

5 Gly
<210> 133
<211> 836
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de anticuerpo

15 <400> 133
ccatggccca ggtgcagctg caggagtccg ggggaggctt agttcaccct ggggggtccc 60
tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca ctttcagtag ctactggatg cactgggtcc 120
20 gccaaagtcc aggaagggg ctggtgtggg tctcacgtat taatagtgat gggagtagca 180
caagctacgc ggactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaac gccaaagaaca 240
cgctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga 300
25 gaaaaatctt gggggtggga gctaggtctc gtogttactt tgactactgg ggccagggaa 360
caatggtcac cgtctcttca aagctttcag ggagtgcac cgccccaaaa cttgaagaag 420
30 gtgaattttc agaagcacgc gtagaaacga cactcacgca gtctccaggc accctgtctt 480
tgtctccagg ggaagagcc accctctcct gcagggccag tcagagtgtt gtcagcaact 540
atttagcctg gtaccagcag aagcctggcc aggctcccag gctcctcacc tctgggtgcat 600
35 ccaacagggc cactggcacc tcagacaggt tcagtggcag tgggtctggg gcagacttca 660
ctctcaccat cagcagagtc gagcctgaag actcagcagt gtattactgt caacagtttg 720
ataagtccac gtggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaagcg gccgctggat 780
40 ccgaacaaaa gctgatctca gaagaagacc taaactcaca tcaccatcac catcac 836

<210> 134
45 <211> 276
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
50 <223> secuencia de anticuerpo
<400> 134

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

	65	70	75	80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
		85	90	95	
5	Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp				
		100	105	110	
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly				
10		115	120	125	
	Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg				
		130	135	140	
15	Val Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro				
		145	150	155	160
	Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Val Ser				
		165	170	175	
20	Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu				
		180	185	190	
	Leu Ile Ser Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe				
25		195	200	205	
	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val				
		210	215	220	
30	Glu Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Ser				
		225	230	235	240
	Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala				
		245	250	255	
35	Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His				
		260	265	270	
	His His His His				
40		275			
	<210>	135			
	<211>	827			
	<212>	ADN			
45	<213>	Secuencia Artificial			
	<220>				
	<223>	secuencia de anticuerpo			
50	<400>	135			
	ccatggccca ggtccagctt gtgcagtctg gggctgaggt gaagaagcct gggtcctcgg				60
	tgaagggtctc ctgcaaggct tctggaggca ccttcagcag ctatgctatc agctgggtgc				120
55	gacaggcccc tggacaaggg cttgagtgga tgggagggat catccctatc tttggtacag				180
	caaactacgc acagaagttc cagggcacag tcacgattac cgcgacgaa tccacgagca				240
	cagcctacat ggagctgagg agcctgagat ctgacgacac ggccgtgtat tactgtgcga				300
60	gagatcggga gagatggcta caatccgcgg gcgactactg gggccaggga accctggcca				360
	ctgtctcctc aaagctttca gggagtgcac ccgccccaaa acttgaagaa ggtgaatttt				420
65	cagaagcacg cgtacagcct gtgctgactc agtcaccctc ggtgtcagtg qccccaggac				480

agacggccag gattacctgt gggggaaaca acattggaag taaaagtgtg cactggtacc 540
 agcagaagcc aggccaggcc cctgtgctgg tcgtctatga tgatagcgac cggccctcag 600
 5 ggatccctga gcgattctct ggctccaact ctgggaacac ggccaccctg accatcagca 660
 gggtcgaagc cggggatgag gccgactatt actgtcaggt gtgggatagt agtagtgatc 720
 10 attgggtgtt cggcggaggg accaagctga ccgtcctagc ggccgctgga tccgaacaaa 780
 agctgatctc agaagaagac ctaaactcac atcaccatca ccatcac 827
 <210> 136
 <211> 273
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 20 <400> 136
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 30 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 35 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Asp Arg Glu Arg Trp Leu Gln Ser Ala Gly Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser
 45 115 120 125
 Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Pro
 130 135 140
 50 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
 145 150 155 160
 Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
 165 170 175
 55 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
 180 185 190
 Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 60 195 200 205
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
 210 215 220
 65 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 225 230 235 240

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

5 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His
260 265 270

His

10 <210> 137
<211> 833
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 137
ccatggccca ggtccagctg gtacagtctg ggggaggcgt ggtccagcct gggagggtccc 60
20 tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca ccttcagtag ctatggcatg cactgggtcc 120
gccaggctcc aggcaagggg ctggagtggg tggcagttat atcatatgat ggaagtaata 180
aatactatgc agactccgtg aaggggccgat tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca 240
25 cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag ctgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga 300
aagatcttcc gattaccgcg gggacagggg ctgactactg gggccaggga accctgggtca 360
30 ctgtctctc aaagctttca gggagtgcac ccgccccaaa acttgaagaa ggtgaatttt 420
cagaagcacg cgtacagtct gtcttgattc agcctgcctc cgtgtctggg tctcctggac 480
agtcgatcac catctcctgc actggaacca gcagtgcgt tgggtggttat aactatgtct 540
35 cctgggtatca acaacaccca ggcaaagccc ccagactcat gatttacgat gtcactagtc 600
ggccctcagg ggtttcgaat cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga 660
40 ccatctctgg gctccaggct gaggacgagg ctgattatta ctgcagttca tatgcaggca 720
gctacagcgt ggtattcggc ggagggacca aggtcaccgt cctagcggcc gctggatccg 780
aacaaaagct gatctcagaa gaagaccta actcacatca ccatcaccat cac 833

45 <210> 138
<211> 275
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> secuencia de anticuerpo

55 <400> 138

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

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

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

65 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

	50	55	60	
5	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80			
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95			
10	Ala Lys Asp Leu Pro Ile Thr Arg Gly Thr Gly Ala Asp Tyr Trp Gly 100 105 110			
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser 115 120 125			
15	Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser 130 135 140			
	Val Leu Ile Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile 145 150 155 160			
20	Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr 165 170 175			
	Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Met Ile 180 185 190			
25	Tyr Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly 195 200 205			
30	Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala 210 215 220			
	Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Ser 225 230 235 240			
35	Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly 245 250 255			
40	Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His 260 265 270			
	His His His 275			
45	<210> 139 <211> 842 <212> ADN <213> Secuencia Artificial			
50	<220> <223> secuencia de anticuerpo			
	<400> 139			
55	ccatggccca ggtccagctt gtgcagtctg gggctgaggt gaagaagcct ggggcctcag tgaaggtctc ctgcaaggct tctggataca ccttcaccgg ctactatatg cactgggtgc gacaggcccc tggacaaggg cttgagtgga tgggacggat caaccctaac agtgggtggca caaactatgc acagaagttt cagggcaggg tcacatgac cagggacacg tccatcagca cagcctacat ggagctgagc aggctgagat ctgacgacac ggccgtgtat tactgcgcgga ggcgtaacct gatagcagct cgtccccgga atcggggcag ggatgctttt gatattctggg gccaaaggac aatgggtcacc gtctcttcaa agctttcagg gagtgcaccc gccccaaaac	60 120 180 240 300 360 420		

24
257

ttgaagaagg tgaattttca gaagcacgcg tagacatcca gatgacccag tctccttcca 480
 ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg ccgggccagt cagagtattg 540
 5 gtggctcggtt ggcttggtat cagcagaaac cagggaaagg ccctaacctc ctgatctatg 600
 ctgcatccac tttgcaaagt ggggtcccat caaggttcag cggcagtgga tctgggacag 660
 10 aattcactct cacaatcagc agcctgcagc ctgaagattc tgcaacttac tactgccaac 720
 actatgaaag ttatcccctc tctttcggcg gcgggaccaa gctggagatc aaagcggccg 780
 ctggatccga acaaaagctg atctcagaag aagacctaaa ctcacatcac catcaccatc 840
 15 ac 842

 <210> 140
 <211> 278
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 25 <400> 140

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 210 215 220
 5 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Glu
 225 230 235 240
 Ser Tyr Pro Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 245 250 255
 10 Ala Ala Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser
 260 265 270
 His His His His His His
 275
 15 <210> 141
 <211> 851
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 141
 25 ccatggccca ggtgcagctg caggagtccg ggggaggctt agttcacctt ggggggtccc 60
 tgagactctc ctgtgcagcc tctggattca ccttcagtag ctactggatg cactgggtcc 120
 gccaaagtcc aggaagggg ctggtgtggg tctcacgtat taatagtgat gggagtagca 180
 30 caagctacgc ggactccgtg aagggccgat tcaccatctc cagagacaac gccagaaca 240
 cgctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga 300
 35 gaaaaatctt gggggtggga gctaggtctc gtcgttactt tgactactgg ggccagggaa 360
 caatggtcac cgtctcttca aagctttcag ggagtgcac cgccccaaa ctgaagaag 420
 gtgaattttc agaagcacgc gtagatattg tgctgaccca gactccagac tccctggctg 480
 40 tgtctctggg cgagacgacc accatcaact gcaagtcac ccagagtgtt ttacacagct 540
 ccaacaataa gaactactta gcttggtacc agcagaaacc aggacagcct cctaagctgc 600
 45 tcatttactg ggcattctacc cggaatccg gggccctga ccgattcagt ggcagcgggt 660
 ctgggacaga ttctactctc accatcagca acctgcagcc tgaagatgtg gctttttact 720
 actgtctgca atattctact ttctctcgga cgttcggcca agggaccaag gtggagatca 780
 50 aagcggccgc tggatccgaa caaagctga tctcagaaga agacctaac tcacatcacc 840
 atcaccatca c 851
 55 <210> 142
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 142
 65 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

5 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Lys Ile Leu Gly Val Gly Ala Arg Ser Arg Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

20 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly
115 120 125

Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
130 135 140

25 Val Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
145 150 155 160

Gly Glu Thr Thr Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His
165 170 175

Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
180 185 190

35 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
195 200 205

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
210 215 220

40 Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Phe Tyr Tyr Cys Leu
225 230 235 240

Gln Tyr Ser Thr Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
245 250 255

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

50 Leu Asn Ser His His His His His His
275 280

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), AFFITECH RESEARCH AS

I (We), AFFITECH RESEARCH AS

domiciliado(s), Oslo Research Park Gaustadalléen 21 N-0349 Oslo, Noruega.

domiciled Oslo Research Park Gaustadalléen 21 N-0349 Oslo, Norway.

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. 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 enseñanzas, lemas comerciales, nombres comerciales, 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 y/o dirección; 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.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. 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, slogans 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, domicile and address 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.

A este efecto, lo(s) faculto(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.

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.

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 E. TORRES CARDOZO, domiciliado(s) en la Calle 70A No. 4-41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

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 appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciled in Calle 70A No. 4-41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

Granted and signed in Oslo

hoy de de 20__

this 20th day of August 20__10

Firma

Signature *Michael Brannagel*

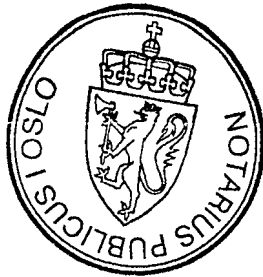
Nombre
Cargo

Name
Title MICHAEL BRANNAGEL
SR. STR. ALLIANCES AND LICENSING
AFFITECH RESEARCH AS

258
261

Certifico a efectos notariales que Michael Braunagel ha firmado el presente documento ante mi.
Oslo byfogdembete, a 20 de agosto de 2010


Notario Público
Wanja Juul
førstekonsulent

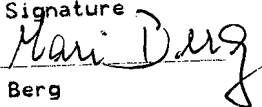
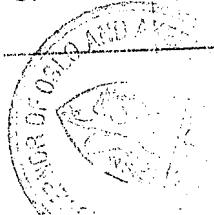


APOSTILLE

(Convention de La Haye du octobre 1961)

1. Country: Norway
2. This public document has been signed by:
Wanja Juul
3. Acting in the capacity of:
Notary Public
4. bears the seal/stamp of:
Notary Public in Oslo

Certified

5. at Oslo
6. the 20.08.2010
7. by the Governor of the counties of
Oslo og Akershus
8. No 68742
10. Signature

Mari Berg
9. Seal/stamp




289
762

Organization number: 976 567 900

Type of company: Limited company

Date of incorporation: 1996-07-04

Registered in the
Register of Business
Enterprises: 1996-08-01

Name: AFFITECH RESEARCH AS

Business address: Gaustadalléen 21
0349 OSLO

Municipality: 0301 OSLO

Country: Norway

Telephone number: + 47 22 95 87 58

E-mail address: info@affitech.com

Share capital NOK: 6,722,093.00

General manager/
managing director: Martin Welschof

Board of directors:
Chairman of the board: Robert Forbes Burns
Grd. House
10 Red Copse Ln Boars Hill
OX15ER Oxford
GREAT BRITAIN

Board member(s): Martin Welschof
Alexander Robert Duncan

Signature: The chairman of the board and
one board member jointly.

Power of procuration: The general manager or the
chairman of the board alone.

Auditor: Certified auditing company
Auditor number 976 389 387
ERNST & YOUNG AS
Christian Frederiks plass 6
0154 OSLO

The Brønnøysund Register Centre

The Register of Business Enterprises,
2010-04-13



Sverre Hovland
Sverre Hovland
Notary Public

for the Brønnøysund Register Centre

Thorleif Holmstrand
Thorleif Holmstrand
Assistant Director





**The Brønnøysund
Register Centre**

The Register of Business Enterprises, NO-8910 Brønnøysund
Organization number: 974 760 673
Internet address: <http://www.brreg.no>

Certificate of Registration

Dep. of Distribution: +47 75 00 75 00
Fax: +47 75 00 75 05

The certificate of registration contains information concerning one particular business enterprise registered in the Register of Business Enterprises, identified by its organization number.

The information contained in the certificate will only pertain to matters registered in the Register of Business Enterprises as of the date of the printout.

Matters for which notification is required and for which notification has not been given, and which are contrary to what has been registered, cannot be brought to bear against a third party, unless said third party was aware of or should have been aware of the matters, cf. the Norwegian Business Enterprise Registration Act § 10-1.

Any person has the right of access to the information registered in the Register of Business Enterprises. This does not apply to (Norwegian) personal identity numbers.

Please note that the appearance of the certificate of registration has been altered in comparison with earlier versions.

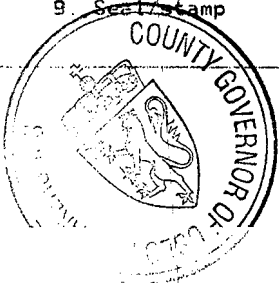
APOSTILLE

(Convention de La Haye du octobre 1961)

1. Country: Norway
2. This public document has been signed by:
Sverre Hovland
3. Acting in the capacity of:
Notary Public
4. bears the seal/stamp of:
The Notary Public in Brønnøysund

Certified

5. at Oslo
6. the 24.09.2010
7. by the Governor of the counties of
Oslo og Akershus
8. No 70591
9. Seal/stamp
10. Signature
Toril Prynmo
Toril Prynmo



264
264

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE PODER OTORGADO POR
AFFITECH RESEARCH AS, con domicilio en Oslo Research Park Gaustadalleen
21 N-0349 Oslo, Noruega.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Noruega

Este documento público

2. ha sido firmado por WANJA JUUL

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/timbre de NOTARIO PÚBLICO EN OSLO

Certificado

5. en Oslo

6. el 20 de agosto de 2010

7. por el Gobernador de las provincias de Oslo y Akershus

8. No. 68742

9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Mari Berg

Hay un sello que dice:

GOBERNADOR DE LAS PROVINCIAS DE OSLO Y AKERSHUS

263

CERTIFICADO DE REGISTRO

Número de la organización: 976 567 900

Tipo de compañía: Compañía limitada

Fecha de incorporación: 1996-07-04

Inscrita en el Registro de Empresas Comerciales: 1996-08-01

Nombre: AFFITECH RESEARCH AS

Dirección: Gaustadalleen 21 0349 Oslo

Municipalidad: 0301 Oslo

País: Noruega

Teléfono: + 47 22 95 87 58

Dirección de correo electrónico: info@affitech.com

Capital social NOK: 6,722,093.00

Gerente general/director corporativo: Martin Welschof

Junta Directiva:
Presidente de la junta: Robert Forbes Burns
Grd. House, 10 Red Copse Ln Boars Hill
OX15ER Oxford
Gran Bretaña

Miembro(s) de la junta: Martin Welschof
Alexander Robert Duncan

Firma: El presidente de la junta y uno de los miembros en conjunto.

Poder de abogado: El Gerente general o el presidente de la junta únicamente.

Auditor: Compañía auditora certificada
Número de auditor 976 389 387
ERNST & YOUNG AS
Christian Frederiks plass 6, 0154 Oslo

El Centro de Registro de Brønnøysund El Registro de Empresas Comerciales

(firma)
Sverre Hovland
Notario Público
para el Centro de Registro de Brønnøysund

(firma)
Thorleif Holmstrand
Director Asistente

Hay un sello que dice:
NOTARIO PÚBLICO

Hay un sello que dice:
EL CENTRO DE REGISTRO DE BRØNNØYSUND, NORUEGA

Fecha de transcripción: 2010-04-13 Número de organización: 976 567 900

263
266

CERTIFICADO DE REGISTRO

El certificado de registro contiene información relacionada con una empresa comercial particular inscrita en el Registro de Empresas Comerciales identificada por su número de organización.

La información contenida en el certificado solo será concerniente a asuntos inscritos en el Registro de Empresas Comerciales a partir de la fecha del listado.

Los asuntos para los cuales se requiera notificación y no se haya entregado, y que sean contrarios a lo que se ha inscrito, no podrán ser presentados contra un tercero, a menos que dicho tercero tenga conocimiento de o haya sido informado de los asuntos, cf. el Registro de Empresas Comerciales de Noruega Acto § 10-1.

Cualquier persona tiene derecho a acceder a la información inscrita en el Registro de Empresas Comerciales. Esto no aplica para números de identificación personal (noruegos).

Tenga en cuenta que la publicación del certificado del registro ha sido modificada en comparación con las versiones anteriores.

264
267

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Noruega

Este documento público

2. ha sido firmado por SVERRE HOVLAND

3. actuando en capacidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/timbre de NOTARIO PÚBLICO EN BRØNNØYSUND

Certificado

5. en Oslo

6. el 24 de septiembre de 2010

7. por el Gobernador de las provincias de Oslo y Akershus

8. No. 70591

9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Toril Prynmo

Hay un sello que dice:

GOBERNADOR DE LAS PROVINCIAS DE OSLO Y AKERSHUS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

121725 263
263

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0079236
		Bogotá D.C., Agosto 01 de 2012 - 15:57:26

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	452410136	01/08/2012	8.850.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-150358- -00000-0000
Fecha: 2012-09-03 16:33:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269
Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

121725 269

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0088393
		Bogotá D.C., Agosto 28 de 2012 - 13:01:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	87623	24/08/2012		1.478.000.00
RECIBO DE CA	999999999	87624	24/08/2012		1.478.000.00
RECIBO DE CA	999999999	87625	24/08/2012		330.000.00
RECIBO DE CA	999999999	87626	24/08/2012		330.000.00

CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	447734770	28/08/2012	7.014.000.00
--------------	-----------------	-----------	-----------	------------	--------------

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
46 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.380.000.00
			\$1.380.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N TRESCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-150358- -00000-0000

Fecha: 2012-09-03 16:33:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

Act. 411 PRESENTACION Folios: 266



No. 12-150358- -00000-0000

Fecha: 2012-09-03 16:33:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378. FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 269

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 266

☐	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 ☐