

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-195608-00000-0000

Fecha: 2012-10-30 17:07:54
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 286

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____
NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 HUMANIZADOS PARA EL TRATAMIENTO

54. **TITULO** _____
DE CANCER

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** _____
PIERRE FABRE MEDICAMENT

DOMICILIO _____
BOULOGNE-BILLANCOURT, FRANCIA

74. **APODERADO** _____
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

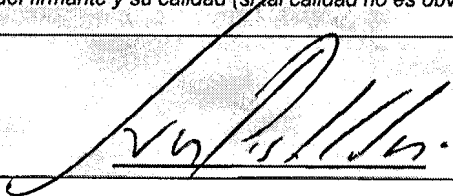
22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-195608- -00000-0000 Fecha: 2012-10-30 17:07:54 Tra. 11 PATENTEIYII Act. 411 PRESENTACION e radicación Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Eve: 379 FASENACIONALII Folios: 286
---	---

AS. 122.681

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/EP2011/054945	Fecha 30.03.2011
Publicación Internacional No.		WO 2011/121040	Fecha 06.10.2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 HUMANIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER			
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
1. PIERRE FABRE MEDICAMENT			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		45, place Abel Gance, F-92100	No. TELÉFONO
CIUDAD		Boulogne-Billancourt	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O FR
PAÍS DE RESIDENCIA		FR	LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. KLINGUER-HAMOUR		Christine	FR
2. JOUHANNEAUD		Alexandra	FR
3. GRENIER-CAUSSANEL		Véronique	FR
4. BERGER		Sven	FR
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. FR		Groisy	73, route de chez Dios-saz, Les Gottalles, F-74570
2. FR		Bonneville	83 Impasse de Cizon, F-74130
3. FR		Saint Martin du Fresne	1 rue de la Vie de l'Orme, F-01430
4. FR		Poisy	135 rue Charles Perrault, F-74330
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
1. US		US	12/749,891
2. EP		EP	10290167.5
3.			
			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010.03.30
			2010.03.30

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>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.</i> ☐ 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		
<i>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.</i> ☐ 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		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ 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. 12-112102, 12-47119	Fecha: 30.10.2012
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 6-216 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 19 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 239- 273 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.		Documentación Jurídica 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: IPRP 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
6 October 2011 (06.10.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/121040 A1(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/EP2011/054945(22) International Filing Date:
30 March 2011 (30.03.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
12/749,891 30 March 2010 (30.03.2010) US
10290167.5 30 March 2010 (30.03.2010) EP(71) Applicant (for all designated States except US):
PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place
Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KLINGUER-
HAMOUR, Christine [FR/FR]; 73, route de chez Dios-
saz, Les Gortalles, F-74570 Groisy (FR). JOUHAN-
NEAUD, Alexandra [FR/FR]; 83 Impasse de Cizon,
F-74130 Bonneville (FR). GRENIER-CAUSSANEL,
Véronique [FR/FR]; 1 rue de la Vic de l'Orme, F-01430
Saint Martin du Fresne (FR).(74) Agent: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 20,
rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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).

Declarations under Rule 4.17:

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

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: HUMANIZED ANTI CXCR4 ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57) Abstract: The present invention relates to a novel isolated humanized antibody, or the derived compounds or functional fragments of same, capable of binding to CXCR4 but also of inducing conformational changed of the CXCR4 homodimers and/or heterodimers. More particularly, the present invention relates to hz515H7 antibodies, specific to the CXCR4 protein, as well as their use for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions composed of such antibodies and a process for the selection of such antibodies are also covered.

WO 2011/121040 A1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2011/054945

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

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

To:
WARCOIN, Jacques Cabinet Regimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 30 August 2012 (30.08.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 357699D28523	
International application No. PCT/EP2011/054945	International filing date (day/month/year) 30 March 2011 (30.03.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address BERGER, Sven 135 rue Charles Perrault F-74330 Poisy France	State of Nationality DE	State of Residence FR
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added as applicant for US only and inventor for all designated States.
--

4. A copy of this notification has been sent to:	
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Forax Richard
Facsimile No. +41 22 338 89 75	e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05

PCT/EP2011/054945

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) v)		an assignment from KLINGUER-HAMOUR, Christine to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 17 June 2010 (17.06.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from JOUHANNEAUD, Alexandra to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 17 June 2010 (17.06.2010)
VIII-2-1(i) v)		an assignment from GRENIER-CAUSSANEL, Véronique to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 17 June 2010 (17.06.2010)

NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-CXCR4 HUMANIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

La presente invención se refiere a un novedoso anticuerpo, en particular a un anticuerpo monoclonal humanizado, capaz de ligarse específicamente a receptores de quimioquina (CXCR), y también se refiere a las secuencias de aminoácidos y a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo tal. En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo novedoso, a los compuestos derivados o fragmentos funcionales del mismo, capaces de ligarse específicamente al CXCR4 y que tienen fuertes actividades antitumorales. La invención también comprende el uso de un anticuerpo tal para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cáncer, así como también los procedimientos o kits relacionados con el diagnóstico de cáncer. Finalmente, la invención comprende composiciones que comprenden un anticuerpo tal en combinación o conjugación con uno o más otros compuestos anticáncer, tales como anticuerpos, toxinas, agentes citotóxicos/citostáticos, y el uso de los mismos para la prevención y/o tratamiento de determinados cánceres.

Las quimioquinas son pequeños péptidos secretados que controlan la migración de los leucocitos a lo largo de un gradiente químico de ligando, conocido como gradiente quimioquina, especialmente durante las inmunorreacciones (Zlotnick A. et al., 2000). Se dividen en dos subfamilias principales, CC y CXC, sobre la base de la posición de sus radicales cisteína NH_2 -terminales, y se ligan a los receptores acoplados a la proteína G, cuyas dos subfamilias principales llevan las designaciones CCR y CXCR. Hasta el presente se han descubierto más de 50 quimioquinas humanas y 18 receptores de quimioquina.

Muchos cánceres tienen una red compleja de quimioquina que influye sobre la infiltración inmunocelular de los tumores, así como también sobre el crecimiento de las células tumorales, su supervivencia, migración y angiogénesis. Las células inmunes, las células endoteliales y las células del tumor, de por sí expresan

receptores de quimioquina y pueden responder a los gradientes de quimioquina. Los estudios efectuados sobre muestras de biopsia de cáncer humano y sobre modelos de cáncer de ratón muestran que la expresión de los receptores de quimioquina de cáncer humano está asociada a un incremento de la capacidad de metástasis. Las células malignas de diferentes tipos de cáncer tienen diferentes perfiles de expresión de los receptores de quimioquina, pero el receptor 4 de quimioquina (CXCR4) es el que se encuentra más comúnmente. Las células de al menos 23 tipos diferentes de cáncer humano de origen epitelial, mesenquimal y hematopoyético, expresan el receptor CXCR4 (Balkwill F. et al., 2004).

El receptor 4 de quimioquina (conocido como fusina, CD184, LESTR o HUMSTR) existe en forma de dos isoformas que comprende 352 ó 360 aminoácidos. El radical Asn11 está glicosilado, el radical Tyr21 ha sido modificado por la adición de un grupo sulfato, y Cys 109 y 186 están ligados con un puente disulfuro sobre la parte extracelulares del receptor (Juárez J. et al., 2004).

Este receptor está expresado por diferentes tipos de tejidos, células nativas, células T que no son de memoria, células T reguladoras, células B, células neutrófilas, células endoteliales, monocitos primarios, células dendríticas, células Killer naturales, células vástago CD34+ hematopoyéticas y con un bajo nivel en corazón, colon, hígado, riñones y cerebro. El CXCR4 desempeña un papel clave en el tráfico de leucocitos, linfopoyesis y mielopoyesis de células B.

El receptor CXCR4 está sobreexpresado en una gran cantidad de cánceres que incluye a título no limitativo el cáncer de colon (Ottiano A. et al., 2004), de pecho (Kato M. et al., 2003), de próstata (Sun Y.X. et al., 2003), de pulmón [carcinoma de células pequeñas y de células no pequeñas] (Phillips R.J. et al., 2003)], de ovario (Scotton C. J. et al., 2002), de páncreas (Koshiba T. et al., 2000), de riñón, de cerebro (Barbero S et al., 2002), glioblastoma y linfomas.

El único ligando del receptor CXCR4 descrito hasta el presente es el SDF-1 (Stromal-cell-Derived Factor-1, Factor 1 derivado de las células estromales) o el CXCL12. El SDF-1 se segrega en grandes cantidades en los nódulos linfáticos, médula de los huesos, hígado, pulmones, y en menor grado por los riñones,

cerebro y piel. El CXCR4 es reconocido por una quimioquina antagonista, la proteína II inflamatoria de macrófago viral (vMIP-II) codificado por el virus del herpes humano de tipo III.

El eje CXCR4/SDF-1 desempeña un papel clave en el cáncer e interviene directamente en la migración, invasión que conduce a metástasis. De hecho, las células de cáncer expresan el receptor CXCR4, migran e ingresan en la circulación sistémica. Las células de cáncer son seguidamente detenidas en lechos vasculares en órganos que producen elevados niveles de SDF-1 donde proliferan, inducen la angiogénesis y forman tumores por metástasis (Murphy PM., 2001). Este eje interviene también en la proliferación de las células por intermedio de la activación de la trayectoria de ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinase, quinasa regulada por señal extracelular) (Barbero S. et al., 2003) y la angiogénesis (Romagnani P., 2004). De hecho, el receptor CXCR4 y su ligando SDF-1 promueven claramente la angiogénesis por el hecho de estimular la expresión de VEGF-A lo que a su vez aumenta la expresión de CXCR4/SDF-1 (Bachelder R.E. et al., 2002). También se sabe que los macrófagos asociados con el tumor (TAM, tumor associated macrophages) se acumulan en las áreas hipóxicas de los tumores y son estimuladas de manera de cooperar con las células tumorales y de manera de promover la angiogénesis. Se ha observado que la expresión es selectivamente regulada ascendentemente por la hipoxia del CXCR4 en diversos tipos de células que incluyen TAM (Mantovani A. et al., 2004). En tiempos recientes se han demostrado que el eje CXCR4/SDF-1 regula el tráfico/homing de células vástago hematopoyéticas/ progenitoras CXCR4+ (HSC) y que desempeñaría un papel en la neovascularización. La evidencia demuestra que además del HSC, el CXCR4 funcional también se expresa en células vástago procedentes de otros tejidos (células vástago dedicados a tejidos, TCSCs = tissue-committed stem cells) por lo que el SDF-1 puede desempeñar un papel inicial en la quimioattractora de los CXCR4+ TCSCs necesarios para la regeneración de órganos protegidos, pero estos TCSC pueden también ser un origen celular del desarrollo de cáncer (teoría de las células vástago de cáncer).

Se demostró un origen de células vástago para el cáncer en el caso de la leucemia humana y en tiempos recientes por diversos tumores sólidos tales como de cerebro y de pecho. Hay varios ejemplos de tumores CXCR4+ que pueden derivar de las células vástago normales específicas para tejidos/órganos CXCR4+ tales como leucemias, tumores del cerebro, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, hepatoblastoma, cánceres de ovario o de cuello de útero (Kucia M. et al., 2005).

Se ha demostrado *in vivo* el apuntamiento a metástasis de cáncer mediante la interferencia con el receptor CXCR4 mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (Muller A. et al., 2001). En pocas palabras, se demostró que un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CXCR4 (Mab 173 R&D Systems) disminuyó de manera significativa la cantidad de metástasis de nódulo linfático en un modelo de cáncer de mama ortotópico (MDA-MB231) en ratones SCID. Otro estudio (Phillips R.J et al., 2003) también demostró el papel crítico del eje SDF-1/CXCR4 en metástasis en un modelo de carcinoma de pulmón ortotópico (A549) para lo cual se utilizaron anticuerpos policlonales contra SDF-1, pero en este estudio no hubo efecto ni sobre el crecimiento de los tumores ni sobre la angiogénesis. En varios otros estudios se describió también la inhibición de sea la metástasis *in vivo* mediante dúplex siRNAs de CXCR4 (Liang Z. et al., 2005) antagonistas péptidos bioestables del CXCR4 (Tamamura H. et al., 2003) o del desarrollo de tumores *in vivo* mediante la utilización del antagonista de molécula pequeña del CXCR4 tal como AMD 3100 (Rubin J.B. et al., 2003; De Falco V. et al., 2007) o Mab (documento de patente WO2004/059285 A2). Por lo tanto, el CXCR4 es un agente terapéutico validado para los cánceres.

El receptor 2 de la quimioquina (CXCR2), otro receptor de quimioquina también ha sido descrito como un objetivo interesante en oncología. De hecho, el CXCR2 transmite una señal de desarrollo celular autocrina en varios tipos de células tumorales, y también puede influir sobre el desarrollo tumoral de manera indirecta por el hecho de promover la angiogénesis (Tanaka T. et al. 2005).

El receptor de quimioquina, CXCR2, abarca 360 aminoácidos. Se expresa principalmente en células endoteliales y especialmente durante la neovascularización. Son varias las quimioquinas que se ligan al receptor CXCR2: CXCL5, -6, -7, IL-8, GRO- α , - β y que forman parte de las quimioquinas proangiogénicas ERL+. El receptor CXCR2 comparte homología de secuencia con el receptor CXCR4: 37% de identidad de secuencia y 48% de homología de secuencia. El eje CXCR2/ligandos interviene en varios mecanismos de desarrollo tumoral tales como la metástasis (Singh RK. et al., 1994) la proliferación de células (Owen J.D. et al., 1997) y en la angiogénesis mediada por las quimioquinas ERL+ (Strieter R.M. et al., 2004; Romagnani et al., 2004). Finalmente, los macrófagos y neutrófilos asociados al tumor son elementos clave en el crecimiento tumoral inducido por la inflamación, y las quimioquinas tales como CXCL5, IL-8 y GRO- α inician el reclutamiento de los neutrófilos.

La dimerización ha surgido como un mecanismo común para regular la función de los receptores acoplados a la proteína G, entre los mismos se encuentran los receptores de quimioquina (Wang J. y Norcross M., 2008). La homo- y heterodimerización en respuesta a la ligación de quimioquina ha demostrado ser necesaria para la iniciación y alteración de la señalización por una cantidad de receptores de quimioquina. Una creciente evidencia soporta el concepto de que los dímeros u oligómeros de receptor son probablemente la unidad funcional básica de los receptores de quimioquina. Se ha comprobado que en ausencia de ligandos y quimioquinas los dímeros de receptor de quimioquina inducen cambios conformacionales de los dímeros receptores. Es sabido que el CXCR4 forma homodímeros pero también heterodímeros, por ejemplo con el receptor δ -opioide (DOR) (Hereld D., 2008) o CCR2 (Percherancier Y. et al., 2005). En este último ejemplo, los péptidos derivados de los dominios transmembrana de la activación, inducida por CXCR4, mediante el bloqueo de las transiciones conformacionales, inducidas por el ligando, del dímero (Percherancier Y. et al., 2005). Otro estudio demostró que el péptido CXCR4-TM4, que es un péptido sintético de la región transmembrana de CXCR4, disminuye la

transferencia de energía entre los protómeros de homodímeros CXCR4 e inhibe la migración, inducida por SDF-1, y la polimerización de actina en células malignas (Wang J. et al., 2006). Más recientemente también se ha descrito que los heterodímeros funcionales formados con CXCR7 reforzaban la señalización inducida por SDF-1 (Sierro F. et al., 2007). Otros ejemplos de heterodímeros constitutivos incluyen estudios que muestran que el CXCR1 y CXCR2 interactúan con otro GPCR (alfa(1A)-adrenoreceptor), lo que indica el carácter específico de la interacción de CXCR1 y CXCR2 (Wilson S. et al., 2005).

Como se mencionó en lo que precede, los receptores CXCR4 y CXCR2 son objetivos interesantes para tumores. Si se interfiere con dichos receptores, se inhibiría el crecimiento de los tumores y las metástasis de una manera muy eficiente, por el hecho de disminuir la proliferación de células tumorales, la angiogénesis, la migración y la invasión de células tumorales, el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos por los tumores, y mediante la emisión de las células vástago de cáncer por CXCR4.

Uno de los aspectos inventivos de la presente invención consiste en generar un anticuerpo monoclonal humanizado que causa cambios conformacionales en los dímeros CXCR4. La invención también abarca el CXCR4 Mab hz515H7 (o fragmentos del mismo) capaces de ligarse a, y de inducir cambios conformacionales, tanto en los homodímeros CXCR4 como en los heterodímeros CXCR4/CXCR2, y por el hecho de tener fuertes actividades antitumorales. El H515H7 induce cambios conformacionales sobre los homodímeros CXCR4 pero también sobre los heterodímeros CXCR4/CXCR2. Esta nueva propiedad debería ser de interés para las aplicaciones terapéuticas contra el cáncer dado los importantes roles de estos dos receptores en el cáncer.

El apuntar tanto a los homodímeros como a los heterodímeros de los receptores ya ha demostrado incrementar el efecto terapéutico de los Mab. De hecho, se ha demostrado por ejemplo, que un Mab (h7C10) que apunte tanto a los receptores IGF-1R como al híbrido insulina/IGF-1 tenía *in vivo* mayor potencial

para inhibir el crecimiento tumoral que un Mab que apuntaba a IGF-1R solamente (Pandini G., 2007).

Por otra parte el anti-CXCR4 Mab hz515H7 es un antagonista silencioso para CXCR4, no cambia la señal de base en los ensayos *in vitro* pero inhibe la señalización inducida por SDF-1 en diversos ensayos (ligación de GTP γ S, liberación de Ca²⁺) y también tiene la capacidad de inhibir *in vitro* la migración de las células, inducida por SDF-1.

Las moléculas que actúan sea como agonistas parciales sea como agonistas inversos presentan una actividad intrínseca en la ausencia de ligandos. Estos tipos de molécula estabilizan un estado de GPCR de elevada afinidad o de baja afinidad, respectivamente, aún en la ausencia de ligando, con lo que activan o inhiben las señales de señalización corriente abajo (Galandin et al., 2007; Kenakin, 2004).

En el caso del hz515H7 Mab, el mismo se comporta como un antagonista silencioso, sin ninguna actividad intrínseca en el receptor CXCR4 en la ausencia de SDF-1. Es probable que este efecto farmacológico esté asociado con efectos secundarios menos adversos en comparación con los agonistas parciales o inversos, como ya se informó para los ligandos de receptor de opioides (Bosier y Hermans, 2007). De hecho, la actividad funcional de hz515H7 Mab depende totalmente de la presencia de SDF-1, y no se observará una modulación de la actividad del receptor CXCR4 en tejidos u órganos en los que el ligando SDF-1 no esté expresado, segregado o provisto por el flujo de sangre. Por lo tanto, es probable que el 515H7 Mab sea menos tóxico en comparación con otros ligandos del receptor CXCR4 con una eficacia positiva o negativa. Además, los antagonistas silenciosos son la especie minoritaria en el espacio farmacológico (Wurch et al., 1999, Kenakin, 2004).

De manera sorprendente, por primera vez, los inventores han logrado generar un anticuerpo humanizado capaz de ligar el CXCR4 pero también capaz de inducir cambios conformacionales de los homodímeros y/o heterodímeros de CXCR4. Más particularmente, el anticuerpo humanizado de la invención es capaz

de inducir cambios conformacionales en los heterodímeros de CXCR4 pero también en los heterodímeros de CXCR4/CXCR2.

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

En este momento debe mencionarse que hasta ahora tales anticuerpos humanizados jamás habían sido descritos en la técnica anterior. Por lo demás, debe mencionarse que nunca se había descrito la existencia de heterodímeros CXCR4/CXCR2.

Una parte de la invención se refiere al descubrimiento de la existencia de un heterodímero formado por CXCR4 y CXCR2.

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

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

- la isoforma receptor 4 de quimioquina (motivo C–X–Cf) b [Homo sapiens] que tiene la secuencia indicada mediante el número de acceso a Genbank NP_003458 (SEQ ID No. 1);
- la isoforma receptor 4 de quimioquina (motivo C–X–C motif) a [Homo sapiens] que tiene la secuencia indicada mediante el número de acceso a Genbank NP_001008540 SEQ ID No. 2);
- una variante transcripcional alternativa o una variante natural de la misma que tiene por lo menos una identidad del 95 % con una de estas isoformas b o a que tienen la secuencia SEQ ID No. 1 o 2; y
- un fragmento de la misma, capaz de ser específicamente reconocido por su SDF–1 (stromal cell–derived factor–1) natural ligando y que tiene preferentemente una longitud de al menos 100, 150 y 200 aminoácidos.

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

- el receptor beta de interleuquina 8 [Homo sapiens] que tiene la secuencia indicada mediante el número de acceso a Genbank NP_001548 (SEQ ID No. 3);
- una variante transcripcional alternativa o una variante natural de la misma que tiene por lo menos una identidad del 95 % con este receptor beta de interleuquina 8 que tiene la SEQ ID No. 3; y
- un fragmento de la misma capaz de ser reconocido específicamente por IL-8 y que tiene preferentemente una longitud de al menos 100, 150 y 200 aminoácidos.

En este aspecto particular, la presente invención también revela un RNA o DNA que codifica un polipéptido que comprende dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

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

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

En este aspecto, la invención revela además un método para la preparación de una célula huésped recombinante que expresa dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, en el que este método comprende un paso de transformación de dicha célula huésped:

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

vector de expresión, tal como un plásmido, que codifica la parte CXCR2 de dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

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

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

La invención también revela un método para seleccionar un compuesto que tiene una actividad anticáncer o que puede utilizarse para la preparación de una composición para el tratamiento del cáncer, caracterizado porque dicho método comprende los pasos siguientes:

- a) poner en contacto una célula huésped recombinante de la presente invención que expresa dicho complejo heterodímero CXCR4/CXCR2, con el compuesto a ser ensayado; y
- b) determinar si este compuesto es capaz de modular, preferiblemente de inhibir, la actividad de este complejo heterodímero CXCR4/CXCR2 en la célula huésped recombinante;

En un primer aspecto, un tema de la presente invención es un proceso para la generación y selección o anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un proceso para la selección de un anticuerpo anti-CXCR4 humanizado, o de uno de los fragmentos o derivados funcionales del mismo, capaz de inhibir la activación tanto dependiente del ligando como independiente del ligando, del CXCR4, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes:

- i) clasificar o preseleccionar los anticuerpos humanizados generados, y seleccionar anticuerpos capaces de ligarse específicamente al CXCR4 y también para modular la activación del CXCR4;

ii) ensayar los anticuerpos seleccionados del paso i), y seleccionar anticuerpos capaces de inducir un cambio conformacional en los homodímeros CXCR4, y seguidamente

iii) ensayar los anticuerpos seleccionados del paso ii) y seleccionar anticuerpos capaces de inducir un cambio conformacional en los heterodímeros CXCR4/CXCR2

Por la expresión “modular” debe entenderse un aumento o una inhibición. Es preferible que los anticuerpos seleccionados de la invención puedan inhibir la activación del CXCR4.

Como se explicó en lo que precede, la inducción de los cambios conformacionales en los dímeros CXCR4 es un aspecto esencial de la invención, ya que tales anticuerpos presentarán un interés real para una mayor población de pacientes.

La generación del anticuerpo puede efectuarse mediante cualquier método conocido de la persona con pericia en la especialidad, tal como por ejemplo mediante anticuerpos humanizados recombinantes diseñados a partir de las CDR secuenciados de anticuerpos murinos segregados por una fusión de una célula de mieloma con células de bazo obtenidas de ratones inmunizados o de otras especies compatibles con las células mieloma seleccionadas [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495–497]. Los animales inmunizados podrían incluir ratones transgénicos con loci de inmunoglobulina humana que seguidamente producen directamente anticuerpos humanos. Otra forma de realización posible podría consistir en la utilización de tecnologías de visualización de fagos para clasificar o preseleccionar bibliotecas.

El paso de la clasificación o preselección i) puede realizarse mediante cualquier método o proceso conocido de la persona con pericia en la especialidad. A título de ejemplos no limitativos pueden mencionarse: ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis FACS y clasificaciones o preselecciones funcionales. Un proceso preferido consiste en una clasificación mediante análisis por FACS sobre transfectante de CXCR4 y al menos una cepa de células tumorales para

asegurar que los anticuerpos producidos serán capaces de también reconocer el receptor nativo sobre células tumorales. Este proceso se describirá con mayor detalle en los ejemplos siguientes.

Por la expresión “modular la activación de CXCR4” se entiende modular por lo menos una de las actividades descritas en los Ejemplos 4, 5, 7 y 11 para el anticuerpo murino, en los Ejemplos 16, 17 y 19 para el anticuerpo quimérico, y en los Ejemplos 27, 24 y 28 para el siguiente anticuerpo humanizado:

Preferentemente para modular:

- La ligación específica en las membranas celulares del ligando SDF-1 sobre el receptor CXCR4 (véanse los Ejemplos 4, 16, 27), particularmente mediante competición sobre membrana de células eucariotas transformadas, tales como membranas de CHO-K1, que expresan de manera estable el receptor CXCR4 humano de tipo salvaje;
- La ligación específica de las membranas celulares del GTP γ S sobre el receptor CXCR4 (véanse los Ejemplos 5, 17, 24), particularmente sobre membranas de células eucariotas transformadas, tales como células NIH-3T3, que de manera estable constitutiva expresen membranas de receptor CXCR4 de tipo salvaje;
- La inhibición, mediada por CXCR4, de la producción de cAMP (véase el Ejemplo 7); y
- La movilización, mediada por el receptor CXCR4, de las reservas de calcio intracelulares (véanse los Ejemplos 11, 19, 28).

Es más preferible que esta modulación de por lo menos una de estas actividades sea una inhibición de la actividad.

En una forma de realización preferida de los pasos ii) e iii) de selección del proceso de la invención, dichos pasos ii) e iii) consisten en evaluar anticuerpos mediante análisis BRET sobre células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP, respectivamente, y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40 %, preferentemente el 45 %, 50 %, 55 % y más preferentemente, el 60 % de la señal de BRET.

La tecnología BRET es una tecnología representativa de la dimerización de

las proteínas [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684–89].

La tecnología BRET, utilizada en los pasos ii) y iii) del proceso, es bien conocida de la personas con pericia en la especialidad, y se la detallará en los ejemplos siguientes. Mas particularmente, el BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, Transferencia Energética de Bioluminiscencia por Resonancia) es una transferencia de energía no radiante que tiene lugar entre un donante bioluminescente (Renilla Luciferase (Rluc)) y un aceptor fluorescente, un mutante de GFP (Green Fluorescent Proteín, Proteína Fluorescente Verde) o YFP (Yellow fluorescent proteín, proteína fluorescente amarilla). En el presente caso se utilizó EYFP (proteína fluorescente amarilla resaltada). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y de la distancia entre el donante y el aceptor. Por lo tanto, la transferencia energética puede tener lugar solamente si las dos moléculas se hallan en estrecha proximidad (1–10 nm). Se utiliza esta propiedad para generar ensayos de interacción entre proteína y proteína. De hecho, a efectos de estudiar la interacción entre dos participantes en la interacción, el primero de los mismos está genéticamente fusionado a la Renilla Luciferase y el segundo al mutante amarillo del GFP. Por lo general, pero no necesariamente, las proteínas de fusión se expresan en células de mamíferos. En la presencia de su substrato permeable (coelenterazina), el Rluc emite luz azul. Si el mutante GFP está a menos de 10 nm con respecto al Rluc, puede tener lugar una transferencia de energía y es posible detectar una señal amarilla adicional. Se mide la señal de BRET como la relación entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donante. Por ello la señal de BRET incrementará a medida que las dos proteínas de fusión son llevadas en proximidad recíproca o si tiene lugar un cambio conformacional que acerque entre si el Rluc y el mutante GFP.

Si el análisis de BRET consiste en una forma de realización preferida, puede utilizarse cualquier método conocido de la persona con pericia en la especialidad para medir los cambios conformacionales en los dímeros CXCR4. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, Transferencia Energética de Fluorescencia por

Resonancia), HTRF (Homogenous Time resolved Fluorescence, Fluorescencia Resuelta en Tiempo), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Microscopía de Formación de Imágenes de Vida Útil de Fluorescencia) o SW-FCCS single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy, espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia de longitud de onda simple).

También podrían utilizarse otras tecnologías clásicas, tales como Co-inmunoprecipitación, Alpha screen, Chemical cross-linking, Double-Hybrid, Affinity Chromatography, ELISA o Far western blot.

En un aspecto particular del proceso de acuerdo con la invención, el paso ii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis BRET sobre células que expresan tanto CXCR4-Rluc como CXCR4-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40 %, de la señal de BRET.

En otro aspecto particular del proceso de acuerdo con invención, el paso iii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis BRET sobre células que expresan tanto CXCR4-Rluc como CXCR2-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos el 40 %, de la señal de BRET.

En un segundo aspecto, un tema de la invención consiste en un anticuerpo humanizado aislado, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, obtenidos mediante dicho proceso. Dicho anticuerpo humanizado o uno de dichos fragmentos o derivados, es capaz de ligar específicamente al CXCR4 humano, y en caso de ser necesario, es además capaz de inhibir la fijación natural de su ligando, siendo dicho anticuerpo humanizado también capaz de inducir cambios conformacionales en los dímeros CXCR4.

Las expresiones “fragmentos y derivados funcionales” se definirán con mayor detalle más adelante en la presente memoria distintiva.

Aquí debe entenderse que la invención no se refiere a los anticuerpos en su forma natural, es decir que no se hallan en su entorno natural sino que han sido capaces de ser aislados o de ser obtenidos por purificación a partir de fuentes naturales, o pueden obtenerse mediante recombinación genética, o mediante

síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá con detalle en lo que sigue.

Mas particularmente, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se describe un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizándose dicho anticuerpo humanizado por el hecho de comprender por lo menos una región CDR determinante complementaria, definida de acuerdo con IMGT, elegida entre las CDR que comprenden las secuencia de aminoácidos SEQ ID Nos. 4 a 9.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado aislado, o a un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende por lo menos una CDR elegida entre las CDR de la secuencias SEQ ID Nos. 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 o por lo menos un CDR, definido de acuerdo con IMGT, cuya secuencia tiene una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de una alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 8 ó 9.

La expresión "fragmento funcional" de un anticuerpo se refiere en particular a un fragmento de anticuerpo con el mismo carácter específico con respecto a CXCR4 que el anticuerpo progenitor, tales como los fragmentos Fv, scFv (sc=single chain, cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualesquier fragmentos cuyas semivida haya sido incrementada. Tales fragmentos funcionales se describirán con mayor detalle en lo que sigue en la presente memoria descriptiva.

Las expresiones "compuesto derivado" o "derivado" se refieren en particular a una proteína ligante compuesto de un andamio péptido y de por lo menos uno de las CDR del anticuerpo original, a efectos de preservar su capacidad de reconocer el CXCR4. Tales compuestos derivados, bien conocidos de una persona con pericia en la especialidad, se definirán en mayor detalle lo que sigue en la presente memoria descriptiva. En otra forma de realización de la invención, el compuesto derivado, o el derivado, puede comprender por lo menos 2,

preferentemente por lo menos 3, con mayor preferencia 4, con mayor preferencia 5 o, lo que es lo más preferible, 6 CDR del anticuerpo original.

Es más preferible que la invención comprenda los anticuerpos humanizados, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención, obtenidos mediante recombinación genética o mediante síntesis química.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el anticuerpo humanizado de acuerdo con invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque consiste en un anticuerpo monoclonal.

La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo proveniente de una población de anticuerpos casi homogénea. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos entre sí por la salvedad de unas pocas mutaciones posibles que se presentan naturalmente y que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo originado del desarrollo de un clon de célula simple (por ejemplo un hibridoma, una célula huésped eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula huésped procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y por lo general se caracteriza por cadenas pesadas de una sola clase y subclase, y por cadenas livianas de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos y están dirigidos contra un único antígeno. Además, y a diferencia con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epitopos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único epitopo del antígeno.

Debe entenderse aquí que la invención no se refiere a anticuerpos humanizados en su forma natural, es decir, no se los toma de su entorno natural sino que se aíslan u obtienen mediante purificación a partir de fuentes naturales o se los obtiene mediante recombinación genética o síntesis química, por lo que pueden llevar aminoácidos no naturales, como se describirá en lo que sigue.

Mas particularmente, de acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo humanizado, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por comprender una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR elegida entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 4, 5 ó 6, o por lo menos una CDR cuya secuencia tiene una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de una alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 ó 6; o comprende una cadena liviana que comprende por lo menos una CDR elegida entre las CDR de las secuencias de aminoácidos SEQ ID No. 7, 8 ó 9, o por lo menos una CDR cuya secuencia tiene una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 7, 8 ó 9.

Es preferible que los anticuerpos humanizados de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caractericen por comprender una cadena pesada que comprende los tres siguientes CDR, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde:

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

De acuerdo con una forma de realización particular, los anticuerpos, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan por comprender una cadena pesada que comprende el CDR-H1 de la secuencia SEQ ID No. 4, el CDR-H2 de la secuencia SEQ ID No. 5 y el CDR-H3 de la secuencia SEQ ID No. 6.

Es aún más preferible que los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caractericen por comprender una cadena liviana que comprende los siguientes tres CDR, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde:

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

De acuerdo con una forma de realización particular, los anticuerpos, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan por comprender una cadena liviana que comprende el CDR-L1 de la secuencia SEQ ID No. 7, el CDR-L2 de la secuencia SEQ ID No. 8 y el CDR-L3 de la secuencia SEQ ID No. 9.

En la presente memoria descriptiva, las expresiones “polipéptidos”, “secuencias de polipéptidos”, “péptidos” y “proteínas fijadas a compuestos de anticuerpos o a sus secuencias”, son intercambiables.

Debe entenderse que la invención no se refiere anticuerpos en su forma natural, es decir no han sido tomados de su entorno natural, sino que han sido aislados u obtenidos mediante purificación a partir de fuentes naturales u obtenidos mediante recombinación genética o síntesis química, y por lo tanto pueden llevar aminoácidos no naturales, como se describirá en lo que sigue.

Se ha definido la numeración única de IMGT a efectos de comparar dominios variables cualquiera sea el receptor de antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132–136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli,

V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55–77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados tienen siempre la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1st-CYS), triptófano 41 (CONSERVED-TRP), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2nd-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT provee una delimitación estandarizada de las regiones de armazón (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes complementarias: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Dado que los huecos As representan posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre ménsulas y separados por puntos, por ejemplo [8.8.13]) constituyen información esencial. La numeración única de IMGT se utiliza para representaciones gráficas 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles (Collares de Perlas) [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857–883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21–30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208–D210 (2004)].

Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CRDs de cadena liviana. En la presente se utiliza la expresión CDR o CDR a efectos de indicar, de acuerdo con el caso, una o varias de estas regiones, o aún la totalidad de ellas, que contienen la mayor parte de los radicales aminoácidos responsables de la ligación por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítopo que reconoce.

En el sentido de la presente invención, la expresión “identidad porcentual” entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos significa el porcentaje de radicales nucleótidos o aminoácido idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenida después de una alineación óptima, siendo dicho porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación entre las dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos se lleva tradicionalmente a cabo comparando las secuencias después de habérselas alineado de manera óptima,

pudiéndose llevar a cabo dicha comparación por segmento o utilizando una “ventana de alineación”. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de mediante una comparación manual, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], mediante el método de la búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o mediante software de computadora en el que se utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante el software de comparación BLAST NR o BLAST P).

Se determina la identidad porcentual entre dos secuencias de ácido nucleicos o de aminoácidos comparando las dos secuencias óptimamente alineadas en las cuales la secuencia de ácido nucleicos o de aminoácidos a ser comparadas puede tener adiciones o supresiones en comparación con la secuencia de referencia para la alineación óptima entre las dos secuencias. Se calcula la identidad porcentual determinando la cantidad de posiciones en la cual el radical aminoácido de un nucleótidos es idéntico entre las dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiéndose la cantidad de posiciones idénticas por la cantidad de posiciones en la ventana de alineación y multiplicándose el resultado por 100 a efectos de obtener la identidad porcentual entre las dos secuencias.

Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST; “BLAST 2 sequences” (Tatusova et al., “Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247–250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, con los parámetros de default (en especial para los parámetros “penalización por huelgo abierto”: 5, y “penalización por huelgo de extensión”: 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz “BLOSUM 62” propuesta por el programa); la identidad porcentual entre las consecuencias a ser comparadas la calcula directamente el programa.

Para la secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen aquellos que contiene la secuencia de referencia, determinadas modificaciones, en especial una supresión, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncación o prolongación. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren aquellas sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos son reemplazados por aminoácidos “equivalentes”. En este caso la expresión “aminoácidos equivalentes” tiene por objeto indicar cualesquiera aminoácidos que tienen una probabilidad de ser sustituidos por uno de los aminoácidos estructurales, sin embargo, sin que por ello se modifiquen las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes ni de los ejemplos específicos definidos en lo que sigue.

Es posible determinar aminoácidos equivalentes sea en base a su homología estructural con los aminoácidos por los cuales se lo sustituye o como resultado de ensayos comparativos relacionados con la actividad biológica de los diversos anticuerpos cuya generación es probable.

A título de ejemplo no limitante, en la siguiente Tabla 1 se resumen las posibles sustituciones de realización probable sin que resulte una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo correspondiente modificado; por supuesto, son posibles las sustituciones diversas bajo las mismas condiciones.

Tabla 1

Radical Original	Sustitución(es)
Ala (A)	Val, Gly, Pro (h)
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glucosa
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Aspecto
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg

Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Las personas con pericia en la especialidad saben que en el estado actual de la tecnología la mayor variabilidad (longitud y composición) entre las seis CDR se halla en las tres CDR de cadena pesada y, más particularmente, en el CDR–H3 de esta cadena pesada. Por lo tanto, será evidente que las CDR característicos preferidos de los anticuerpos de la invención, o de uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, serán las tres CDR de una cadena pesada.

En otra forma de realización de la invención se revela un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que comprende:

una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes:

CDR–H1 de la secuencia SEQ ID No. 4 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 4;

CDR–H2 de la secuencia SEQ ID No. 5 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 5;

CDR–H3 de la secuencia SEQ ID No. 6 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No 6;

y una cadena liviana que comprende las tres CDR siguientes:

CDR–L1 de la secuencia SEQ ID No. 7 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 7;

CDR–L2 de la secuencia SEQ ID No. 8 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 8;

CDR-L3 de la secuencia SEQ ID No. 9 o de una secuencia con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 9.

Otro aspecto de la invención es el que se refiere a los fragmentos funcionales del anticuerpo humanizado arriba descrito. Como será evidente para la persona con pericia en la especialidad, un fragmento funcional es necesariamente un fragmento ligante, es decir, un fragmento capaz de ligarse al mismo objetivo que el anticuerpo progenitor. Un fragmento funcional, por lo demás, conserva la función del anticuerpo progenitor. En particular, un fragmento funcional de la invención es capaz de modular la activación del CXCR4. Es más preferible que un fragmento funcional de acuerdo con la invención sea capaz de inhibir la activación del CXCR4. En una forma de realización, la activación del CXCR4 depende del ligando; en otra forma de realización, dicha activación del CXCR4 no depende del ligando.

En una forma de realización preferida, los fragmentos funcionales de la invención conservan la función del anticuerpo progenitor que consiste en modular la actividad del complejo heterodímero CXCR4/CXCR2. Es preferible que dichos fragmentos funcionales conserven la capacidad de inhibir la actividad del complejo heterodímero CXCR4/CXCR2.

Mas particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo, a los compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualesquiera fragmentos cuya semivida ha sido incrementada tales como fragmentos PEGilados.

Tales fragmentos funcionales del anticuerpo de acuerdo con la invención consisten, por ejemplo en los fragmentos Fv, scFv (sc=simple chain, cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualesquiera fragmentos cuyas semivida haya sido incrementada mediante modificación química, tales como la adición de polialquilenglicoles tales como polietilenglicol (PEGilación) (los fragmentos PEGilados llevan la denominación Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG,

F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o mediante la incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, poseyendo dichos fragmentos por lo menos uno de los CRDs característicos de los anticuerpos humanizados de la invención que en especial sea capaz de ejercer de una manera general una actividad, aún parcial, del anticuerpo del cual ha surgido.

Es preferible que dichos fragmentos funcionales comprendan o incluyan una secuencia parcial de una cadena pesada o liviana del anticuerpo a partir del cual se han derivado, siendo dicha secuencia parcial suficiente para conservar el mismo carácter específico de ligación que el anticuerpo del cual ha surgido y una afinidad suficiente, preferiblemente por lo menos igual a 1/100, con mayor preferencia por lo menos igual a 1/10 de la del anticuerpo del cual ha surgido.

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

Es preferible que estos fragmentos funcionales sean de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que por lo general tengan el mismo carácter específico de la ligación que el anticuerpo del cual resultan. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos del anticuerpo de la invención pueden obtenerse a partir de los anticuerpos descritos en que precede mediante métodos tales como digestión de enzimas, lo que incluye pepsina o papaína, y/o mediante desdoblamiento de los puentes disulfuro por producción química. También es posible obtener los fragmentos de anticuerpo mediante técnicas genéticas recombinantes conocidas de una persona con pericia en la especialidad o mediante síntesis de péptidos para lo cual se utilizan por ejemplo sintetizadores automáticos de péptidos tales como los comercializados por Applied BioSystems, etc.

Mas particularmente, la invención se refiere a diferentes variantes de anticuerpo humanizado del 515H7 Mab murino, que en la presente memoria descriptiva llevan la designación de i) HZ515H7, Hz515H7 o hz515H7 Mab y ii)

HZ515H7–2, Hz515H7–2 o hz515H7–2 Mab o iii) cualquier combinación de una cadena liviana y/o de una cadena pesada de dichas variantes de anticuerpo.

Para mayor claridad, en la siguiente Tabla 2 se consignan las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes a las CDR de la variantes humanizadas (que también llevan la denominación de “formas”) hz515H7 y hz515H7–2 de la invención, en la Tabla 2b se consignan las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios variables y a las secuencias de longitud completa de las diversas variantes de la forma humanizada hz515H7 de la invención, y en la Tabla 2c se consignan las diversas secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios variables y a las secuencias de longitud completa de la forma humanizada hz515H7–2 de la invención.

Tabla 2a

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
CDR(s)	CDR–H1	–	4
	CDR–H2	–	5
	CDR–H3	–	6
	–	CDR–L1	7
	–	CDR–L2	8
	–	CDR–L3	9

Tabla 2b

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
Dominios variables	VH1	–	10
	VH1 D76N	–	11
	VH1 V48L D76N	–	12
	VH2	–	13
	–	VL1	14
	–	VL1 T59A E61D	15
	–	VL2	16
	–	VL2.1	17
	–	VL2.2	18
	–	VL2.3	19
	–	VL3	20
Secuencias	VH1	–	21

completas (sin péptido señal)	VH1 D76N	–	22
	VH1 V48L D76N	–	23
	VH2	–	24
	–	VL1	25
	–	VL1 T59A E61D	26
	–	VL2	27
	–	VL2.1	28
	–	VL2.2	29
	–	VL2.3	30
	–	VL3	31

Tabla 2c

Anticuerpo Hz515H7–2	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
Dominios variables	“consenso”	–	85
	–	“consenso”	86
	VH1	–	87
	–	VL1	88
Secuencias completas (sin péptido señal)	“consenso”	–	89
	–	“consenso”	90
	VH1	–	91
	–	VL1	92

A título de ejemplo, para evitar cualquier duda, la expresión “VH1” es similar a las expresiones “VH Variante 1”, “VH variante 1”, “VH Var 1” o “VH var 1). La obtención de las secuencias “de consenso” se describe en el Ejemplo 22.

Y otro aspecto específico de la presente invención es el que se refiere a un anticuerpo humanizado, o a sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque las regiones constantes de una cadena liviana y de una cadena pesada derivadas del anticuerpo humano son, respectivamente la región lambda o kappa y la región gamma–1, gamma–2 o gamma–4.

La invención describe el hibridoma murino que secreta un anticuerpo monoclonal presentado ante la Colección Fancesa de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia) el 25 de junio de 2008, bajo el número I–4019. Se obtuvo dicho hibridoma mediante la fusión de esplenocitos de ratones Balb/C inmunizados de las cepas de mieloma Sp 2/O–Ag 14.

El anticuerpo monoclonal murino, que en la presente se designa como 515H7 es secretado por el hibridoma presentado ante el CNCM el 25 de junio de 2008 bajo el número I-4019.

La invención también describe anticuerpos quiméricos.

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

Estos anticuerpos, o fragmentos quiméricos de los mismos, pueden prepararse mediante las técnicas de la genética recombinante. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico podría prepararse clonando ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano de la invención, en especial murino, y una secuencia que codifica la región constante del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de acuerdo con la invención codificado por un gen recombinante tal podría ser, por ejemplo, una quimera ratón-humano, determinándose el carácter específico de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y determinándose su isotipo por la región constante derivada del ADN humano. Ver: Verhoeyn *et al.* (BioEssays, 8:74, 1988) para hallar métodos para la preparación de anticuerpos quiméricos.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de un anticuerpo quimérico (que lleva la designación c515H7 VH) que comprende una secuencia de región variable, seleccionada, SEQ ID No. 83.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena liviana de un anticuerpo quimérico (que lleva la designación c515H7 VL) que comprende una región variable de la secuencia SEQ ID No. 84.

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

secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 83, y una secuencia de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No.84.

La expresión “anticuerpo humanizado”, tal como se la utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que comprende por lo menos una cadena pesada o una cadena liviana, derivándose dicha cadena pesada o liviana que contiene regiones CDR, de un anticuerpo de origen no humano, siendo las otras partes de la molécula del anticuerpo de origen humano (por ejemplo, dichas otras partes pueden ser derivadas de uno (o varios) anticuerpos humanos). Por lo tanto, mediante la expresión “anticuerpo humanizado”, la presente invención comprende anticuerpos con solamente una cadena humanizada, siendo el segundo una cadena quimérica o murina. Es preferible que un “anticuerpo humanizado” de la invención comprenda dos cadenas humanizadas, es decir, que tanto una cadena pesada como una cadena liviana estén humanizadas.

Los anticuerpos humanizados de la invención o los fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante técnicas conocidas de la persona con pericia en la especialidad (tales como, por ejemplo, las descritas en los documentos Singer *et al.*, J. Immun., 150:2844–2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1–142, 1992; y Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10:169–175, 1992). Se prefieren tales anticuerpos humanizados para su utilización en métodos en los que intervienen diagnósticos *in vitro* o tratamientos preventivos y/o terapéuticos *in vivo*. También es posible utilizar otras técnicas de humanización, también conocidas de una persona con pericia en la especialidad, tales como, por ejemplo, la técnica de “injerto de CDR” descrita por PDL en las patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 y US 5.693.761. Patentes US 5.639.641 o 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

La invención se refiere a los anticuerpos humanizados originados del anticuerpo murino 515H7 descrito en lo que precede.

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

Más particularmente, la invención se refiere a una cadena pesada de un anticuerpo humanizado que comprende i) una región de armazón homóloga con respecto a una correspondiente región de armazón de una cadena pesada de un anticuerpo humano; e ii) CDR homólogos con respecto a correspondientes CDR de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, consistiendo dichos CDR en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.

En otras palabras, la invención se refiere a una cadena pesada de un anticuerpo humanizado que tiene CDR que consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, comprendiendo dichos CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6. Será evidente, para la persona con pericia en la especialidad, que es posible seleccionar diferentes cepas germinales para la humanización del anticuerpo 515H7, obteniéndose por lo tanto diferentes formas de 515H7 humanizado. Más particularmente, en una forma de realización preferida no limitante, es posible utilizar diferentes cepas germinales para la secuencia que codifica los genes v mientras que se conservarán las mismas cepas germinales para los genes j.

Para la presente invención, las cepas germinales que podrían utilizarse se seleccionan en base a dos criterios complementarios:

- La longitud en aminoácidos para cada uno de los CDR debe ser idéntica entre el CDR murino y el equivalente en la cepa germinal;
y
- La secuencia de la cepa germinal, expresada en aminoácidos, debe tener una identidad de al menos el 70% con la secuencia murina progenitora.

Para evitar dudas, se recuerda aquí que la presente invención abarca dos formas humanizadas no limitantes (que también llevan versiones en cuanto a

designación) del mismo anticuerpo 515H7. La primera de ellas, que lleva la designación Hz515H7, consiste en un anticuerpo humanizado obtenido con las cepas germinales IGHV3-49*04 (SEQ ID No. 77) y IGHJ4*01 (SEQ ID No. 81) para una cadena pesada y IGKV4-1*01 (SEQ ID No. 78) y IGKJ1*01 (SEQ ID No. 82) para una cadena liviana. La segunda de ellas, que lleva la designación Hz515H7-2, consiste en un anticuerpo humanizado obtenido con las cepas germinales IGHV3-73*01 (SEQ ID No. 79) y IGHJ4*01 (SEQ ID No. 81) para una cadena pesada y IGKV2D-40*01 (SEQ ID No. 80) y IGKJ1*01 (SEQ ID No. 82) para una cadena liviana.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 85 ó 87.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena pesada de anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12 ó 13.

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

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

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

En otra forma de realización más, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 ó 91.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23 ó 24.

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

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

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

Más en particular, la invención se refiere a una cadena liviana de anticuerpo humanizado que comprende i) una región marco homóloga a la correspondiente región marco de una cadena liviana de anticuerpo humano y ii) CDR homólogas a las correspondientes CDR de un anticuerpo derivado de una especie mamífera diferente, en donde dichas CDR consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

En otras palabras, la invención se refiere a una cadena liviana de anticuerpo humanizado que tiene CDR que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dichas CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una cadena liviana de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 86 u 88.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana del anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana de anticuerpo humanizada H515H7-2 que comprende una región variable de secuencia SEQ ID No. 86.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana de anticuerpo humanizada H515H7-2 que comprende una región variable de secuencia SEQ ID No. 88.

En otra forma de realización más, la invención también se refiere a la región variable de cadena liviana de anticuerpo humanizado H515H7-2 de secuencia SEQ ID No. 88 que comprende una o varias sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a una cadena liviana de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90 ó 92.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana del anticuerpo humanizado H515H7 que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana de anticuerpo humanizada H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEQ ID No. 90.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la cadena liviana de anticuerpo humanizada H515H7-2 que comprende la secuencia completa SEQ ID No. 92.

En otra forma de realización más, la invención también se refiere a la cadena liviana de anticuerpo humanizada H515H7-2 de secuencia SEQ ID No. 92

que comprende una o varias sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L.

Más en particular, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende cadenas pesadas y livianas que tienen cada una i) regiones marco homólogas a las correspondientes regiones marco de un anticuerpo humano y ii) CDR homólogas a las correspondientes CDR de un anticuerpo derivado de una especie mamífera diferente, en donde dichas CDR consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprende, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6 y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena liviana que comprende, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

En otras palabras, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado comprende cadenas pesadas y livianas, en donde dicha cadena pesada tiene CDR que consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y dicha cadena liviana tiene CDR que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6 y said CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 83, 85 ó 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 84, 86 u 88.

En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12 ó 13 y una región

variable de cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20.

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

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

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

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

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

En otra forma de realización más, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada humanizada, combinada con una cadena liviana quimérica.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada quimérica, combinada con una cadena liviana humanizada.

Más en particular, la invención describe un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 86 u 88.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL1 T59A E61D o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 15.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 16.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL2.1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 17.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL2.2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 18.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL2.3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 19.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7 VL3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 20.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 86.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado c515H7 VH / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 83 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88.

En otra forma de realización, la invención describe un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada del

grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 85 ó 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 / c515H7 VL o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 10 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N / c515H7 VL o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N / c515H7 VL o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH2 / c515H7 VL o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 13 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 85 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / c515H7 VL o un compuesto derivado o uno de sus

fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 84.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 ó 91 y una cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90 ó 92.

En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7 que comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23 ó 24 y una cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30 ó 31.

En otra forma de realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 89 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 90.

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

En otra forma de realización más, la invención también se refiere al anticuerpo humanizado H515H7-2 que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 que comprende una o varias sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y A81L y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92 que comprende una o varias sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en D40A, L43Q, Y59A, A61D, S69T, G74E y D76Y.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado H515H7 VH1 D76N VL2 o un compuesto derivado o uno de sus

fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 16.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 27.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 17.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 28.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 18.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 29.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de

secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 19.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N VL2.3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 30.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 T59A E61D o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 15.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N VL1 T59A E61D o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 26.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 10 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 21 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 10 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH2 / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 13 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 21 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 D76N / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH1 V48L D76N / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92.

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7 VH2 / Hz515H7-2 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 24 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL1 T59A E61D o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 15.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 16.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 17.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 18.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 19.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 20.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL1 T59A E61D o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 26.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 27.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.1 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 28.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.2 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 29.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL2.3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 30.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere al anticuerpo humanizado Hz515H7-2 VH1 / Hz515H7 VL3 o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 31.

Se debe entender que las combinaciones de VH / VL antes ejemplificadas no son limitativas. El experto en la técnica podría reordenar, de hecho, sin carga indebida y sin aplicar una técnica de la invención, todas las VH y VL reveladas en la presente memoria descriptiva. El experto en la técnica podría, así, obtener todos los anticuerpos humanizados correspondientes a todas las combinaciones de todas las VH y VL reveladas en la presente solicitud.

Un nuevo aspecto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado porque está seleccionado entre los siguientes ácidos nucleicos (incluyendo todo código genético degenerado):

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican una cadena pesada de anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención;
- b) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican una cadena liviana de anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención;
- c) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención;
- d) un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico tal como se define en a), b) o c);
- e) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas con al menos una cadena pesada que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID No. 38 a 41, 49 a 52, 93 ó 95 preferentemente con al menos una de sus 3 CDR de acuerdo con IMGT o la numeración CDR de Kabat;
- f) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas con al menos una cadena liviana que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID No. 42 a 48, 53 a 59, 94 ó 96 preferentemente con al menos una de sus 3 CDR de acuerdo con IMGT o la numeración CDR de Kabat.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos de CDR-H1 de SEQ ID No. 32; una secuencia de nucleótidos de CDR-H2 de SEQ ID No. 33; y una secuencia de nucleótidos de CDR-H3 de SEQ ID No. 34.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena liviana de un anticuerpo humanizado, en donde una secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana comprende una secuencia de nucleótidos de CDR-L1 de SEQ ID No. 35 ó 60; una secuencia de nucleótidos de CDR-L2 de SEQ ID No. 36 ó 61; y una secuencia de nucleótidos de CDR-L3 de SEQ ID No. 37 ó 62.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana de un anticuerpo humanizado,

en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos de CDR-H1 de SEQ ID No. 32; una secuencia de nucleótidos de CDR-H2 de SEQ ID No. 33; y una secuencia de nucleótidos de CDR-H3 de SEQ ID No. 34;

en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana comprende una secuencia de nucleótidos de CDR-L1 de SEQ ID No. 35 ó 60; una secuencia de nucleótidos de CDR-L2 de SEQ ID No. 36 ó 61; y una secuencia de nucleótidos de CDR-L3 de SEQ ID No. 37 ó 62.

La Tabla 3a siguiente resume las secuencias de nucleótidos optimizadas correspondientes a las CDR del anticuerpo hz515H7 de la invención; la Tabla 3b resume las diversas secuencias de nucleótidos optimizadas correspondientes a los dominios variables y las secuencias de longitud total de las diversas variantes del anticuerpo humanizado hz515H7 de la invención. La Tabla 3c resume las diversas secuencias de nucleótidos optimizadas correspondientes a los dominios variables y las secuencias de longitud total de la versión humanizada hz515H7-2 de la invención.

Tabla 3a

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
CDR optimizada	CDR-H1	–	32
	CDR-H2	–	33
	CDR-H3	–	34
	–	CDR-L1	35
		CDR-L1 (bis)	60
	–	CDR-L2	36
		CDR-L2 (bis)	61
	–	CDR-L3	37
		CDR-L3 (bis)	62

Tabla 3b

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
Dominios variables	VH1	–	38
	VH1 D76N	–	39
	VH1 V48L D76N	–	40
	VH2	–	41
	–	VL1	42
	–	VL1 T59A E61D	43
	–	VL2	44
	–	VL2.1	45
	–	VL2.2	46
	–	VL2.3	47
	–	VL3	48
Secuencias completas (sin péptido señal)	VH1	–	49
	VH1 D76N	–	50
	VH1 V48L D76N	–	51
	VH2	–	52
	–	VL1	53
	–	VL1 T59A E61D	54
	–	VL2	55
	–	VL2.1	56
	–	VL2.2	57
	–	VL2.3	58
	–	VL3	59

Tabla 3c

Anticuerpo Hz515H7-2	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
Dominios variables	VH1	–	93
	–	VL1	94
Secuencias completas (sin péptido señal)	VH1	–	95
	–	VL1	96

La expresión “secuencia optimizada” significa que los codones que codifican los aminoácidos constitutivos de la proteína de interés (en este caso, los dominios variables del anticuerpo) han sido optimizados para un mejor reconocimiento por la maquinaria de traducción en un tipo de célula dedicado, en la presente células de mamíferos. En este aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteína dada codificada por la secuencia optimizada es idéntica a la de la secuencia no optimizada, pero la secuencia de nucleótidos es diferente. La optimización también incluye la adaptación del contenido de G/C y la prevención de la estructura secundaria estable de ARN (véase como ejemplo Kim et al., 1997 Gene199 (1–2):293–301).

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del CDR–H1 murino (SEQ ID No. 71) ha sido optimizada y corresponde a la secuencia de nucleótidos del CDR–H1 humanizado (SEQ ID No. 32) en donde los codones ggg, act y gat (que codifican los radicales Gly, Thr y Asp, respectivamente) han sido reemplazados por los codones ggc, acc y gac, respectivamente (que también codifican los radicales Gly, Thr y Asp, respectivamente).

En cuanto a CDR–H2 y CDR–H3 (SEQ ID Nos. 72 y 73, respectivamente), también han sido optimizados, y corresponden a las CDR optimizados de SEQ ID Nos. 33 y 34, respectivamente.

Rige lo mismo para las tres CDR de una cadena liviana (SEQ ID Nos. 74, 75 y 76, respectivamente) con dos formas humanizadas correspondientes a los VL1, VL2 y VL3 (SEQ ID Nos. 35, 36 y 37, respectivamente) y a los VL2.1, VL2.2 y VL2.3 (SEQ ID Nos. 60, 61 y 62, respectivamente).

En la siguiente Tabla 4 se consignan las CDR originales, es decir las secuencias murinas no optimizadas.

Tabla 4

Anticuerpo 515H7	Cadena pesada	Cadena liviana	SEQ ID NO.
murine CDR(s)	CDR-H1	–	71
	CDR-H2	–	72
	CDR-H3	–	73
	–	CDR-L1	74
	–	CDR-L2	75
	–	CDR-L3	76

Las expresiones “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácidos nucleicos”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia de polinucleótidos” y “secuencia de nucleótidos”, utilizadas de manera intercambiable en la presente memoria descriptiva, se refieren a una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que definen un fragmento o una región de un ácido nucleico, y que es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, o productos de transcripción de dichos ADNs.

Aquí también debería mencionarse que la presente invención no se refiere a secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, se las muestrea directa o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, habiéndose modificado al menos parcialmente su entorno. Aquí también deberían mencionarse los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante genética recombinante por intermedio de células huéspedes, u obtenidos mediante síntesis química.

La expresión “secuencias nucleicas que presentan una identidad porcentual de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, después de alineación óptima con una secuencia preferida” se refiere a secuencias de nucleótidos que presentan, con respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia, determinadas modificaciones tales como, en particular, una supresión,

una truncación, una extensión, una fusión quimérica y/o una sustitución, en especial puntual. Es preferible que se trate de secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos que la secuencia de referencia, relacionándose esto con la degeneración del código genético, o con secuencias de complementariedad de las que es probable que se hibridan específicamente con las secuencias de referencia, preferentemente bajo condiciones muy estrictas en especial las definidas en lo que sigue.

La hibridación bajo condiciones muy estrictas significa que las condiciones relacionadas con temperatura e intensidad iónica se seleccionan de manera tal que permiten que se mantenga la hibridación entre dos fragmentos de ADN de complementariedad. Sobre una base puramente ilustrativa, es ventajoso que las condiciones muy estrictas del paso de la hibridación a los fines de definir los fragmentos de polinucleótidos descritos en lo que precede sean las siguientes:

La hibridación de ADN-ADNA o ADN-ARN se lleva a cabo en dos pasos: (1) prehibridación a 42°C durante tres horas en tampón fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5X SSC (1X SSC corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato de sodio 0,015 M), formamida al 50%, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, Denhardt's 10X, sulfato de dextrano al 5%, y ADN de esperma de salmón al 1%; (2) hibridación primaria durante 20 horas a una temperatura que depende de la longitud de la sonda (es decir, 42°C para una sonda >100 nucleótidos de longitud) seguido por dos lavados de 20 minutos a 20°C en 2X SSC + 2% SDS, un lavado de 20 minutos a 20°C en 0.1X SSC + 0.1% SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0.1X SSC + 0.1% SDS durante 30 minutos a 60°C para una sonda >100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación muy estrictas descritas en lo que precede para un nucleótido de tamaño definido pueden ser adaptadas por una persona con pericia en la especialidad para oligonucleótidos más largos o más cortos, de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook, *et al.* (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001).

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

En especial, la invención está orientada a la clonación y/o vectores de expresión que contienen una secuencia de nucleótidos tal.

Los vectores de la invención contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias de nucleótidos en una célula huésped dada. Por lo tanto, el vector debe contener un promotor, señales de iniciación de y terminación de traducción, así como también regiones adecuadas para la regulación de la transcripción. Ha de ser capaz de mantenerse de una manera estable en la célula huésped y puede opcionalmente tener señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos los selecciona una persona con pericia en la especialidad de acuerdo con la célula huésped utilizada. Para esta finalidad, las secuencias de nucleótidos pueden insertarse en vectores autorreplicantes dentro del huésped elegido, o ser vectores integrantes del huésped elegido.

Tales vectores se preparan mediante métodos típicamente utilizados por una persona con pericia en la especialidad, y es posible introducir los clones resultantes en un huésped adecuado mediante métodos estándar tales como lipofección, electroporación, shock térmico, o métodos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plásmido o viral. Se los utiliza para transformar células huéspedes a efectos de clonar o expresar las secuencias de nucleótidos de la invención.

La invención también comprende células huéspedes transformadas, por lo que comprenden un vector descrito en la presente invención.

La célula huésped puede seleccionarse entre sistemas procariotas o eucariotas tales como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de levadura o células de animales, en especial células de mamíferos. También es posible utilizar células de insectos o de plantas.

La invención se refiere a animales, que no sean humanos, que tienen una célula transformada de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es el que se refiere a un método para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la invención, o de uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho método comprende los pasos siguientes:

a) el cultivo en un medio de cultivo bajo las condiciones de cultivo adecuadas para una célula huésped de acuerdo con la invención; y

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

Las células transformadas de acuerdo con la invención tienen un uso en los métodos para la preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los métodos para la preparación de polipéptidos de acuerdo con la invención en forma recombinante, caracterizados porque dichos métodos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, también se hallan incluidos en la presente invención. Es preferible que se cultive una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido anteriormente mencionado y la recuperación de dicho polipéptido recombinante.

Como ya se mencionó, es posible seleccionar la célula huésped entre sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótidos de la invención que facilitan la secreción en un sistema procariota o eucariota de este tipo. Un vector de acuerdo con la invención que lleve una secuencia de este tipo, puede por lo tanto utilizarse de una manera ventajosa para la producción de proteínas recombinantes a ser secretadas. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho de que se hallan presentes en el material sobrenadante del cultivo celular en lugar de dentro de las células huéspedes.

Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse mediante síntesis química. Uno de tales métodos es también un objeto de la invención. Una persona con pericia en la especialidad conoce métodos para la síntesis química, tales como técnicas en fase sólida (véase en especial Steward *et al.*, 1984, Solid

phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed.) o técnicas en fase sólida parcial, mediante condensación de fragmentos o mediante síntesis convencional en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y capaces de contener aminoácidos no naturales también se hallan incluidos en la invención.

Los anticuerpos, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, cuya obtención mediante el método de la invención es probable, también se hallan comprendidos en la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención se refiere a un anticuerpo descrito en lo que precede, caracterizado porque es además capaz de ligarse específicamente a un receptor de la familia de las quimioquinas humanas y/o capaz de inhibir específicamente la señalización de un receptor tal.

De acuerdo con una forma de realización novedosa, la invención se refiere a un anticuerpo, o a sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que consiste en un anticuerpo que es biespecífico en el sentido de que comprende un segundo motivo capaz de interactuar con cualquier receptor que interviene en el desarrollo de tumores, tales como, por ejemplo, VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, tetraspaninas, integrinas, CXCR4 (diferente del anticuerpo de la presente invención, es decir, que apunta a otro epítipo), CXCR7 o CXCR2.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales constituyen una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que se combinan dos regiones variables en la misma molécula (Hollinger y Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419). Su utilidad ha sido demostrada tanto en el dominio de diagnóstico como terapéutico en cuanto a su capacidad de reclutar nuevas funciones efectoras o para apuntar a varias moléculas sobre la superficie de las células tumorosas; tales anticuerpos pueden obtenerse mediante métodos químicos (Glennie MJ *et al.*, 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. *et al.*, 1995, J. Hemat., 377-382) o mediante métodos somáticos (Staerz U.D. y Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457; Suresh M.R. *et al.*, 1986, Method Enzymol.,

121:210–228) pero también, y esto es preferible, mediante técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y por lo tanto facilitan la purificación del anticuerpo deseado (Merchand *et al.*, 1998, *Nature Biotech.*, 16:677–681).

Estos anticuerpos biespecíficos pueden construirse como IgG entero, Fab'2 biespecífico, Fab'PEG, diacuerpos o scFv biespecífico, pero también como un anticuerpo biespecífico tetravalente en el que se hallan presentes dos sitios de ligación para cada antígeno apuntado (Park *et al.*, 2000, *Mol. Immunol.*, 37(18):1123–30) o los fragmentos de los mismos descritos en lo que precede.

Además de la ventaja económica, dado que la producción de un anticuerpo biespecífico es más económica que la producción de dos anticuerpos específicos, el uso de tales anticuerpos biespecíficos tiene la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. De hecho, el uso de un anticuerpo biespecífico hace que sea posible disminuir la cantidad total de anticuerpos en circulación, y por lo tanto, una posible toxicidad.

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

Finalmente, la presente invención se refiere al anticuerpo descrito en lo que precede, o a sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, para su uso como un fármaco.

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

La invención también se refiere a una composición caracterizada porque comprende, adicionalmente, a título de producto de combinación para su uso de una manera simultánea, separada o extendida, un anticuerpo anti-tumor que no es un anticuerpo dirigido contra el CXCR4.

De acuerdo con otra forma de realización más, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica descrita en lo que precede que comprende por lo menos un segundo compuesto antitumor seleccionado entre los compuestos capaces de inhibir específicamente la actividad de la tirosina quinasa de receptores tales como IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR o VEGF, o cualquier otro compuesto antitumor conocido de una persona con pericia en la especialidad.

En un segundo aspecto de la presente invención, dicho segundo compuesto puede seleccionarse entre los anticuerpos antiEGFR, antiIGF-IR, antiHER2/neu, anticMET, VEGFR, VEGF, etc., aislados, o sus fragmentos funcionales y compuestos derivados, capaces de inhibir la actividad proliferante y/o anti-apoptótica y/o angiogénica y/o inductiva de la diseminación de metástasis promovida por dichos receptores.

También es adecuado mencionar los anticuerpos antiCD20 tales como rituximab, ibritumomab o tositumomab; los anticuerpos antiCD33 tales como gemtuzumab o lintuzumab; los anticuerpos antiCD22 tales como epratuzumab; los anticuerpos antiCD52 tales como alemtuzumab; los anticuerpos antiEpCAM tales como edrecolomab, Ch 17-1A o IGN-101; los anticuerpos antiCTP21 o 16 tales como Xactin; los anticuerpos antiDNA-Ag tales como ^{131}I -Cotara TNT-1; los anticuerpos antiMUC1 tales como pentumomab o R1150; los anticuerpos antiMUC18 tales como ABX-MA1; los anticuerpos antiGD3 tales como mitumomab; los anticuerpos antiECA tales como CeaVac o labetuzumab; los anticuerpos antiCA125 tales como OvaRex; antiHLA-DR los anticuerpos tales como apolizumab; los anticuerpos antiCTLA4 tales como MDX-010; los anticuerpos antiPSMA tales como MDX-070, ^{111}In & ^{90}Y -J591, ^{177}Lu J591, J591-DM1; los anticuerpos antiLewis y los anticuerpos tales como IGN311; los anticuerpos de antiangiogenesis tales como AS1405 y 90YmuBC1; los anticuerpos antiTrail-R1 tales como TRAIL R1mAb o TRAIL R2mAb.

Otra forma de realización complementaria de la invención consiste en una composición como la descrita en lo que precede que comprende adicionalmente, a

título de producto de combinación o de conjugación para uso simultáneo, separado o prolongado, un agente citotóxico/citostático.

La expresión “uso simultáneo” se refiere a la administración de ambos compuestos de la composición comprendidos en una forma de dosificación única.

La expresión “uso separado” se refiere a la administración, al mismo tiempo, de ambos compuestos de la composición, comprendidos en formas de dosificación distintas.

La expresión “uso prolongado o extendido” se refiere a la administración sucesiva de ambos compuestos de la composición, cada uno de ellos comprendido en una forma de dosificación distinta.

En términos generales, la composición de acuerdo con la invención incrementa considerablemente la efectividad del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención se refuerza de una manera no prevista mediante la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsiguiente importante producida por una composición de la invención se refiere a la posibilidad de utilizar dosis menos efectivas del ingrediente activo, por lo que se hace posible evitar o reducir la aparición de riesgos secundarios, en particular el efecto del agente citotóxico. Por lo demás, esta composición hace que sea posible lograr más rápidamente el efecto terapéutico previsto.

La expresión “agente terapéutico anticáncer” o “agente citotóxico” se refiere a una sustancia que, cuando se la administra a un paciente, trata o previene el desarrollo de cáncer en el paciente. Los ejemplos, no limitantes, de tales agentes incluyen los agentes “de alquilación”, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores del funcionamiento de la cromatina, antiangiogénicos, antiestrógenos, antiandrógenos e inmunomoduladores.

Tales agentes se mencionan por ejemplo en VIDAL, en la página dedicada a compuestos relacionados con oncología y hepatología bajo el encabezamiento “Citotóxicos”; los compuestos citotóxicos mencionados a título de referencia de este documento se mencionan en la presente como agentes citotóxicos preferidos.

La expresión “agente de alquilación” se refiere a cualquier sustancia que pueda ligarse de manera covalente con, o que pueda alquilarse de manera covalente con cualquier molécula, preferentemente un ácido nucleico (por ejemplo, ADN), dentro de una célula. Los ejemplos de tales agentes de alquilación incluyen las mostazas tales como ecloretamina, clorambucil, melfalan, clorhidrato, pipobroman, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; las oxazafosfinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida o ifosfamida; aziridinas o etilén-iminas tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; las nitrosoureas tales como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; los alquil sulfonatos tales como busulfan, treosulfan o improsulfan; los triazenos tales como dacarbazina; o los complejos de platino tales como cisplatina, oxaliplatina o carboplatina.

La expresión “antimetabolito” se refiere a una sustancia que bloquea el metabolismo celular por el hecho de interferir con determinadas actividades, en términos generales con la síntesis de ADN. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen el metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinósido, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deoxicoformicina y pentostatina.

La expresión “antibiótico antitumoral” se refiere a un compuesto que puede prevenir o inhibir la síntesis de ADN, ARN y/o proteínas. Los ejemplos de tales antibióticos antitumorales incluyen doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, valrubicin, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

Los “inhibidores mitóticos” previenen la progresión normal del ciclo y la mitosis de las células. En términos generales, los inhibidores de los microtúbulos o los “taxoides” tales como el paclitaxel y docetaxel tienen la capacidad de inhibir la mitosis. Los alcaloides vinca, tales como la vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, son también capaces de inhibir la mitosis.

Los “inhibidores de la cromatina” o “inhibidores de topoisomerasa” son sustancias que inhiben el funcionamiento normal de proteínas que forman cromatina, tales como las topoisomerasas I y II. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen, para la topoisomerasa I: la camptotecina y sus derivados, tales como irinotecan o topotecan; para la topoisomerasa II, etoposide, etoposide fosfato y teniposide.

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

Un “antiestrógeno” o “antagonista de estrógeno” se refiere a cualquier sustancia que disminuya, antagonice o inhiba la acción de los estrógenos. Los ejemplos de tales agentes incluyen: tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

La expresión “antiandrógeno” o “antagonista de andrógeno” se refiere a cualquier sustancia que reduzca, antagonice o inhiba la acción de los andrógenos. Los ejemplos de antiandrógenos incluyen flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, acetato de ciproterona, finasterida y cimitidina.

Los inmunomoduladores son sustancias que estimulan el sistema inmunológico. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen el interferón, las interleuquinas tales como aldesleuquiina, OCT-43, denileuquina diftitox o interleuquina-2, los factores de necrosis de los tumores tales como tasonermina, u otros tipos de inmunomoduladores tales como lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, thymopentine, poli I:C o levamisole en combinación con 5-fluorouracil.

Para más detalles, una persona con pericia en la especialidad puede referirse al manual publicado por la French Association of Therapeutic Chemistry

Teachers intitulado "Therapeutic Chemistry, vol. 6, Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer, TEC y DOC edition, 2003 [en francés]".

En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición de la invención se caracteriza porque dicho agente citotóxico está ligado químicamente a dicho anticuerpo para su uso simultáneo.

En una forma de realización especialmente preferida, dicha composición se caracteriza porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona entre los inhibidores o estabilizantes de husillo, preferentemente vinorelbine y/o vinflunine y/o vincristine.

A efectos de facilitar la ligación entre dicho agente citotóxico y el anticuerpo de acuerdo con la invención, es posible introducir moléculas distanciadoras entre los dos compuestos a ser ligados tales como el poli(alquilen)glicol o los aminoácidos, o, en la otra forma de realización, utilizar los derivados activos de los agentes citotóxicos, dentro de los cuales se han introducido funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de ligación son bien conocidas en la especialidad y no serán objeto de mayor exposición en la presente memoria descriptiva.

Otros inhibidores de EGFR incluyen, a título no limitativo, los anticuerpos monoclonales C225 y antiEGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) o los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), flunomide (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GMBH/Roche), Naamidine A (Bristol-board Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer), WHI-P97 (Parker Hughes

Center Cancer), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) o la "vacuna EGFR" (York Medical/Centro de Inmunología Molecular).

Otro aspecto de la invención es el que se refiere a una composición caracterizada porque por lo menos uno de dichos anticuerpos, o de los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, está combinado o conjugado con una toxina celular y/o con un radioisótopo.

Es preferible que dicha toxina o dicho radioisótopo sea capaz de prevenir el crecimiento o proliferación de las células tumorales, en especial que sea capaz de desactivar por completo dicha célula tumoral.

También es preferible que dicha toxina sea una toxina enterobacteriana, en especial la exotoxina A de *Pseudomonas*.

Los radioisótopos preferentemente combinados con anticuerpos terapéuticos son radioisótopos que emiten rayos gamma, preferentemente iodo¹³¹, itrio⁹⁰, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos que emiten rayos alfa y gamma también pueden utilizarse en una terapia.

La expresión "toxina o radioisótopo combinados con por lo menos un anticuerpo de la invención, o con un fragmento funcional del mismo" se refiere a cualquier medio que hace que sea posible ligar dicha toxina o dicho radioisótopo a dicho al menos un anticuerpo, en especial mediante ligación covalente entre los dos compuestos, con o sin la introducción de la molécula ligante.

Los ejemplos de agentes que permiten la ligación química (covalente), electrostática o no covalente de la totalidad o de parte de los elementos del conjugado incluyen, en particular, benzoquinona, carbodiimida y mas particularmente EDC (1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida-clorhidrato), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tioacetato (SATA), agentes puenteantes con uno o más grupos, con uno o más grupos fenilasida, que reaccionan con rayos ultravioleta (UV), más preferentemente N-[4 (azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimidil 3(2-piridilditio) propionato (SPDP) y 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otras forma de ligación, en especial para radioisótopos, puede consistir en el uso de agentes quelantes de iones bifuncionales.

Los ejemplos de tales agentes de quelación incluyen los quelantes derivados de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o DTPA (ácido dietilentriaminepentaacético) que fueron desarrollados para ligar metales, particularmente metales radioactivos, con inmunoglobulinas. Por lo tanto, el DTPA y sus derivados pueden sustituirse sobre la cadena de carbono por diversos grupos de una manera tal de incrementar la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek *et al.*, 1977; Brechbiel *et al.*, 1991; Gansow, 1991; patente US 4.831.175).

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

También es preferible que dicho al menos un anticuerpo de la invención que forma dicho conjugado, sea seleccionado entre sus fragmentos funcionales, en especial fragmentos que han perdido su componente Fc, tales como los fragmentos cFv.

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

La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo, o de un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, preferentemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un fármaco destinado a inhibir el desarrollo de células tumorales. En términos generales, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o de un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo,

preferentemente humanizado, y/o de una composición, para la preparación de un fármaco para la prevención o tratamiento del cáncer.

Los cánceres preferidos que pueden prevenirse y/o tratarse incluye el cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de endometrio, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, o cualquier otro cáncer.

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

Otro aspecto de la invención es el que se refiere a la utilización del anticuerpo como arriba descrito en un método de diagnóstico, preferentemente *in vitro*, de enfermedades relacionadas con el nivel de expresión del CXCR4. Es preferible que dichas enfermedades relacionadas con la proteína CXCR4 en dicho método de diagnóstico consistan en cánceres.

Por lo tanto, los anticuerpos de la invención, o los compuestos derivados o fragmentos funcionales de los mismos, pueden emplearse en un método para la detección y/o cuantificación de la proteína CXCR4 en una muestra biológica *in vitro*, en especial para el diagnóstico de enfermedades asociadas con una expresión anormal con esta proteína, tales como cánceres, comprendiendo dicho método los pasos siguiente:

- a) colocar la imagen biológica el contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo;
- b) demostrar el complejo antígeno–anticuerpo posiblemente formado.

Por lo tanto, la presente invención también comprende los kits o accesorios para la implementación de un método como descrito en lo que precede, que comprende los elementos siguientes:

- a) un anticuerpo policlonal o monoclonal de la invención;
- b) opcionalmente, reactivos para constituir el medio favorable para las reacciones inmunológicas;

c) opcionalmente, reactivos que revelan los complejos antígeno-anticuerpos producidos por la reacción inmunológica.

En términos generales, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo, o de un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende los siguientes tres CDRs, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena liviana que comprende los siguientes tres CDRs, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8, 9, para diagnosticar in vitro un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4 o para determinar in vitro el pronóstico de un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4.

En cuanto a este respecto, la presente invención están particularmente orientada a la utilización de un anticuerpo humanizado de cadena pesada y/o de un anticuerpo humanizado de cadena liviana y/o de un anticuerpo humanizado, o de un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención, para diagnosticar in vitro un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4 o para determinar in vitro el pronóstico para desarrollar un trastorno oncogénica asociado con la expresión CXCR4.

En otro aspecto, la presente invención está orientada a un proceso para detectar in vitro la presencia y/o la publicación de un CXCR4 expresa un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes: (a) poner en contacto una muestra tomado de un sujeto con un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEQ ID No. 4, 5 y 6; y una cadena liviana que comprende los tres CRDs siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8, 9, y (b) detectar la ligación de dicho anticuerpo con la muestra.

En particular, la presente invención está orientada a un proceso para detectar in vitro la presencia y/o la publicación de un CXCR4 que expresa un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes:

- (a) poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un anticuerpo humanizado de cadena pesada y/o con un anticuerpo humanizado de cadena liviana y/o con un anticuerpo humanizado, o con un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención; y
- (b) detectar la ligación de dicho anticuerpo no muestra.

A título de ejemplo no limitante, dicha detección puede efectuarse mediante FACS, o mediante cualquier otra técnica conocida por la persona con pericia en la especialidad.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un proceso para determinar in vitro el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4 en sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes: (a') poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un anticuerpo, o con un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena liviana que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8, 9, y (b') cuantificar el nivel de anticuerpo que se liga a CXCR4 en dicha muestra.

En particular, la presente invención está dirigida a un proceso para determinar in vitro el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4 tomado de un sujeto, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes:

- (a') poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un anticuerpo humanizado de cadena pesada y/o con un anticuerpo humanizado de cadena liviana y/o un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención; y
- (b') cuantificar el nivel del anticuerpo que se liga al CXCR4 en dicha muestra.

En una forma de realización preferida, el nivel de región del CXCR4 se mide mediante inmunohistoquímica (IHC).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para diagnosticar en vitro un tumor que expresa CXCR4 o para determinar in vitro el pronóstico del desarrollo de un tumor que expresa CXCR4 en un sujeto, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes: (i) determinar el nivel de expresión de CXCR4 de acuerdo con la presente invención, en particular implicando anticuerpos humanizados de la presente invención, e (ii) comparar el nivel de expresión del paso (i) con un nivel de expresión de referencia de CXCR4 de tejido normal.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor de un sujeto, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes: (1) determinar el nivel de expresión de CXCR4 de acuerdo con la presente invención, que en particular implica utilizar anticuerpos humanizados de la presente invención; (2) asignar un puntaje a dicho tumor en cuanto al nivel de expresión del CXCR4, (3) comparar dicho puntaje con el puntaje obtenido de una muestra de control.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para determinar si un trastorno oncogénico es apto para un tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o con un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes:

(a) determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor de un sujeto de acuerdo con la invención; y

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preselección y/o identificación de moléculas como agentes anti tumorales antagonistas de CXCR4, que comprende los pasos siguientes:

a) seleccionar células expresan CXCR4,

b) incubar dichas células con un anticuerpo, o con un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena liviana que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8, 9, y

c) evaluar las moléculas ensayadas en cuanto a su inhibición potencial de la ligación entre el anticuerpo, o de uno de sus fragmentos funcionales o derivados, al CXCR4, y

d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En este aspecto, la presente invención se refiere en particular a un proceso para la preselección y/o identificación de moléculas como agentes anti tumorales antagonistas de CXCR4, que comprende los pasos siguientes:

a) seleccionar células que expresan CXCR4,

b) incubar dichas células con una cadena pesada de anticuerpo humanizado y/o con una cadena liviana de anticuerpo humanizado, y/o con un anticuerpo humanizado, o con un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención, y

c) evaluar las moléculas ensayadas en cuanto a su inhibición porcentual de la ligación entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, al CXCR4, y

d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende por lo menos un anticuerpo, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena liviana que comprende los tres CDRs siguientes, respectivamente CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8, 9, siendo preferible que dicho anticuerpo esté etiquetado.

En este aspecto, la presente invención se refiere en particular a un kit que comprende por lo menos una cadena pesada de anticuerpo humanizado y/o una cadena liviana de anticuerpo humanizado y/o a anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención, siendo preferible que dicho anticuerpo esté etiquetado.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de acuerdo con la presente invención para determinar el status de CXCR4 de un tumor, comprendiendo además dicho kit:

i) un reactivo útil para detectar el grado de ligación entre dicho anticuerpo anti anti-CXCR4 y el CXCR4; y

ii) muestras de control positivo y negativo útiles para asignar un puntaje al nivel de expresión del CXCR4.

Es ventajoso que los anticuerpos o fragmentos funcionales del mismo puedan ser inmovilizados sobre un soporte, en especial un chip de proteína, Uno de tales chips de proteína constituyó objeto de la invención.

Es ventajoso que los chips de proteína puedan utilizarse en los kits o accesorios requeridos para detectar y/o cuantificar la proteína CXCR4 en una muestra biológica.

Debe aclararse que en la presente la expresión "muestra biológica" se refiere a muestras tomadas de un organismo vivo (en especial sangre, tejidos, órganos u otras muestras tomadas de un mamífero, en especial un ser humano), o cualquier muestra, de los cuales puede decirse es probable que contengan un proteína CXCR4 de este tipo (tales como una muestra de células, transformada en caso de necesidad).

Dicho anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, pueden hallarse presentes en forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo etiquetado a efectos de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos etiquetados de la invención, o los fragmentos funcionales del mismo, incluyen, por ejemplo, conjugados de anticuerpos (inmunoconjugados), que pueden combinarse por ejemplo con enzimas tales como peroxidasa,

fosfatasa alcalina, α -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetil-colinesterasa, lisozima, malato dehidrogenasa o glucosa-6 fosfato dehidrogenasa o por una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromo-desoxiuridina. Las etiquetas fluorescentes también pueden combinarse con los anticuerpos de la invención o con fragmentos funcionales de los mismos, lo que incluye en especial la fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, proteína fluorescente verde (GFP, green fluorescent protein), dansilo, umbelliferona, etc. En tales conjugados, los anticuerpos de la invención o los fragmentos funcionales de los mismos pueden prepararse mediante métodos conocidos de la persona experta en la especialidad. Se los puede ligar con enzimas o con etiquetas fluorescentes directamente, por intermedio de un grupo separador o un grupo de enlace tal como polialdehído, glutaraldehído, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) o ácido dietilentriaminepentaacético (DTPA); o en la presencia de agentes ligantes tales como los anteriormente mencionados para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que llevan fluoresceína pueden prepararse por reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados pueden también incluir etiquetas quimioluminescentes tales como luminol y dioxetano, etiquetas bioluminescentes tales como luciferasa y luciferina, o etiquetas radioactivos tales como iodo¹²³, iodo¹²⁵, iodo¹²⁶, iodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, fluor¹⁸, itrio¹⁹⁹ e iodo¹³¹. Para los radioisótopos de diagnóstico pueden utilizarse los métodos conocidos de la persona experta en la especialidad para ligar radioisótopos con anticuerpos, sea directamente sea por intermedio de un agente de quelación tales como los EDTA o DTPA mencionados arriba. También debe mencionarse el etiquetado con [¹²⁵I]Na mediante la técnica de cloramina-T [Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962) *Nature* 194:495]; el etiquetado con tecnecio^{99m} descrito por Crockford *et al.* (Patente de EE.UU. de América N° 4,424,200) o

ligado mediante DTPA descrito por Hnatowich (Patente de EE.UU. de América N° 4,479,930).

También se revela la utilización del anticuerpo de la invención como biomarcador. Los métodos puede utilizarse para detectar o diagnosticar diversos trastornos oncogénicos hiperproliferativos asociados con la expresión de CXCR4 y ejemplificados a título no limitante, por los siguientes: cáncer de pecho, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cánceres de piel, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer colorectal, osteosarcomas, neuroblastoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide agudas, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloide múltiple, linfomas, cáncer de riñón, glioblastoma, cáncer de tiroides, rabdomiosarcoma, o cualquier otro cáncer asociado con la expresión de CXCR4. Como reconocerá una persona con la pericia habitual en la especialidad, el nivel de expresión del anticuerpo asociado con un trastorno particular variará en función de la naturaleza y/o gravedad de la condición preexistente.

La administración de anticuerpos de la presente invención en cualquiera de las vías de administración convencionales conocidas de la persona experta (por ejemplo, tópica, parenteral, intramuscular, etc.), proveerá un método extremadamente útil para detectar células displásicas en una muestra, además de permitir que un clínico supervise el régimen terapéutico de un paciente sometido a un tratamiento por un trastorno hiperproliferativo asociado con, o mediado por, la expresión de CXCR4.

En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la formación en vivo de imágenes de un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4, que comprende el anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado o un fragmento del mismo que está etiquetado y que se liga al CXCR4 in vivo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo de la invención, o un fragmento funcional o derivado del mismo, encontrará un uso en diversas finalidades médicas o de investigación, lo

que incluye la detección, diagnóstico, y determinación de la etapa de diversas patologías asociadas con la expresión de CXCR4.

La determinación de la etapa tiene un valor potencial para los pronósticos y provee un criterio para diseñar la terapia óptima [Simpson et al. J. Clin. Oncology 18:2059 (2000)]. En términos generales, por ejemplo la determinación de la etapa patológica de cáncer de pecho, es preferible a la determinación de etapa clínica por cuanto éste último provee un pronóstico más exacto. Sin embargo, sería preferible una determinación clínica de la etapa si la misma fuera tan exacta como la determinación patológica, por cuanto no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido destinado una evaluación patológica.

Cuando se lo utiliza con etiquetas adecuadas o con otras biomoléculas o productos químicos detectables, el anticuerpo de la invención es particularmente útil para aplicaciones de diagnóstico y de pronóstico in vitro y en vivo.

Las etiquetas para utilizar en los inmuno ensayos son en términos generales conocidas de las personas con pericia en la especialidad, e incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminescentes y cromogénicas, lo que incluye partículas de color tales como oro coloidal o pellas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays, ensayos inmunosorbentes ligados a enzima). Diversos tipos de etiquetas y métodos para conjugar las etiquetas a los anticuerpos de la invención son bien conocidos de la persona con pericia especialidad, tales como los que se indican más adelante en la presente.

Tal como se la utiliza en la presente, la expresión “trastorno oncogénico asociado contra la expresión de CXCR4” tiene por objeto incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de elevados niveles o de niveles anormalmente bajos de CXCR4 (aberrante) en un sujeto que sufre del trastorno, ha demostrado ser, o se sospecha que sea, responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuir al empeoramiento del trastorno. Como alternativa, tales trastornos pueden ser puestos en evidencia, por ejemplo, por un incremento en los niveles de CXCR4 sobre la superficie celular de las células o

tejidos afectados de un sujeto que sufra el trastorno. El incremento en los niveles de CXCR4 puede detectarse por ejemplo, utilizando el anticuerpo 515H7 o hz515H7 de la invención. Más aún, se refiere a las células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, por lo que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación de las células. Como alternativa, las células pueden expresar niveles normales de CXCR4 pero estar marcadas por una proliferación anormal.

En determinadas formas de realización, la expresión "expresión incrementada" referida a CXCR4, se refiere al nivel de expresión de la proteína o de gen que demuestra un incremento estadísticamente significativo de la expresión (medida mediante expresión de ARN o mediante la expresión de proteínas) con respecto a un control.

Mas particularmente, se considera la utilización de un anticuerpo, o de un fragmento funcional o derivado del mismo, de acuerdo con la invención, como arriba descrito, para el diagnóstico in vitro de un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4 o para la determinación in vitro del pronóstico del desarrollo de un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4, por ejemplo un cáncer asociado con la expresión de CXCR4.

Otro aspecto amplio de acuerdo con la invención es el que se refiere a un método para diagnosticar un trastorno oncogénico hiperproliferativo patológico, o una sensibilidad a una condición patológica asociada con la expresión de CXCR4 en un sujeto, que comprende determinar la presencia o ausencia de células portadoras de CXCR4 en una muestra, y diagnosticar una condición patológica o una sensibilidad a una condición patológica sobre la base de la presencia o ausencia de dichas células portadoras de CXCR4. Los usos del anticuerpo de la invención para efectuar diagnósticos comprenden tumores primarios, metástasis de cánceres, células vástago de cáncer. El anticuerpo puede hallarse presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo etiquetado de manera de obtener una señal detectable y cuantificable.

Mas particularmente, un sujeto preferido de acuerdo con la invención consiste en un proceso para detectar in vitro la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa CXCR4 en un sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes: (a) poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un anticuerpo, o con un fragmento funcional o derivado del mismo, de acuerdo con la invención, y (b) detectar la ligación de dicho anticuerpo con la muestra. Otro aspecto de la invención es el seguimiento de la expresión de CXCR4 en forma de una respuesta a la terapia apuntada contra CXCR4 durante los ensayos clínicos, y más particularmente cuando la regulación descendente y/o la degradación del receptor CXCR4 es un componente del mecanismo de acción del compuesto ensayado.

Como será evidente para la persona con pericia, la detección de la ligación del anticuerpo de la invención puede revelarse mediante diversos ensayos. Si bien cualquier medio para llevar a cabo los ensayos es compatible con la invención, puede mencionarse a título de ejemplo, FACS, ELISA o IHC.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "muestra" tiene por objeto referirse al cualquier fluido biológico, célula, tejido, órgano o porción del mismo, que incluya o potencialmente incluya una célula neoplásica, tal como una célula tomada de colon, gástrica, recto, pecho, ovario, próstata, riñón, pulmón, sangre, cerebro, piel, tiroides nódulos linfáticos, médula de hueso u otro órgano o tejido que contenga una célula neoplásica o del que se sospecha que lo contiene. El término incluye muestras presentes en un individuo así como también muestras obtenidas o derivadas del individuo. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección histológica de un espécimen obtenido por biopsia, o células que se han colocado o adaptado en un cultivo de tejidos. Además, una muestra puede ser una fracción o extracto subcelular, o una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura o una preparación de proteínas.

La muestra clínica tiene por objeto abarcar una variedad de tipos de muestras obtenidas tomadas de un sujeto y útiles en el procedimiento de la invención, tales como por ejemplo, un ensayo de diagnóstico o de supervisión

para determinar por detectar niveles de expresión de CXCR4. La definición abarca muestras de tejidos sólidos obtenidos mediante remoción quirúrgica, un espécimen de patología, una muestra archivada, un espécimen de biopsia, cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos, o frotis preparados a partir de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos, no limitantes, abarcan muestras tomadas de colon, gástrico, recto, dicho, ovario, próstata, riñón, pulmón, sangre, cerebro, piel, tiroides, nódulos linfáticos, médula de hueso, etc. La definición también abarca muestras líquidas de origen biológico, y puede referirse sea a células sea a fragmentos de células suspendidas en ella, o al medio líquido y sus solutos.

Otro aspecto de acuerdo con la invención se refiere a un proceso para determinar in vitro el nivel de expresión de CXCR4 en un tumor que expresa CXCR4 tomado de un sujeto, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes: (a') poner en contacto una muestra tomada del sujeto con un anticuerpo, o con un fragmento funcional o derivado del mismo, de acuerdo con la invención, y (b') cuantificar el nivel de ligación del anticuerpo al CXCR4 en dicha muestra.

Como sea evidente para la persona con pericia en la especialidad, el nivel de la ligación del anticuerpo al CXCR4 puede ser cuantificado de diversas maneras, tales como mediante diferentes ensayos. Si bien cualquier medio para llevar a cabo los ensayos es compatible con la invención, en un método preferido se hacen intervenir procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por técnica de inmunofluorescencia, por técnica de inmunohistoquímica o radioinmunoensayo (RIA) o equivalente.

Es preferible que la muestra biológica esté formada por un fluido biológico, tal como suero, sangre, células, una muestra de tejidos o biopsias de origen humano. La muestra puede influir por ejemplo tejido de biopsia, que puede ser sometido de manera conveniente a ensayo para establecer la presencia de un trastorno oncogénico proliferante patológico asociado con la expresión de CXCR4.

Una vez que se haya efectuada la determinación de la cantidad de CXCR4 presente en la muestra del ensayo, es posible comparar los resultados con los resultados de las muestras de control, que se han obtenido de una manera similar a los compuestos de ensayo pero a partir de individuos que no tienen, o que no presentan, un trastorno oncogénico hiperproliferativo asociado con la expresión de CXCR4. Si el nivel del CXCR4 se muestra significativamente elevado en la muestra de ensayo, puede llegarse a la conclusión de que existe una mayor probabilidad de que el sujeto del cual se la tomado, tiene o desarrollará dicho trastorno.

Más particularmente, la invención se refiere a un proceso para diagnosticar in vitro un tumor que expresa CXCR4 o para determinar in vitro el pronóstico de desarrollo de un tumor que expresa CXCR4 en sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes: (i) determinar el nivel de expresión de CXCR4 como arriba descrito, e (ii) comparar el nivel de expresión del paso (i) con un nivel de expresión de referencia de CXCR4 tomado de un tejido normal o de un tejido que no expresa g CXCR4.

La expresión "diagnosticar una enfermedad", tal como se utiliza en la solicitud, tienen por objeto incluir, por ejemplo diagnosticar o detectar la presencia de un trastorno oncogénico hiperproliferativo patológico asociado con, o mediado por, la expresión de CXCR4, supervisar el avance o desarrollo de la enfermedad, e identificar o detectar células o muestras que serán indicativas de un trastorno asociado con la expresión asociada con la expresión de CXCR4.

Tal como se lo utiliza en la presente, el término "Pronóstico" significa la probabilidad de recuperarse de una enfermedad o la predicción del probable desarrollo o resultado de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra tomada de un sujeto presenta una reacción positiva al teñido con el anticuerpo de la invención, entonces el pronóstico para dicho sujeto es mejor que si la muestra hubiese sido negativa en cuanto al tenido con CXCR4. Las muestras pueden recibir un puntaje para expresar los niveles de expresión de CXCR4 en una escala adecuada, como se describirá con mayor detalle en lo que sigue.

Sin embargo, otro aspecto de la invención se refiere también a la supervisión de la expresión del CXCR4 para los compuestos terapéuticos que inducen una degradación del CXCR4 como uno de sus mecanismos de acción. En dicho caso, el seguimiento de la expresión de la expresión del CXCR4 sobre la membrana de las células sería una herramienta crítica para evaluar la eficacia del tratamiento durante las pruebas clínicas y durante las terapias “personalizadas”.

Es ventajoso comparar o medir el nivel de expresión del CXCR4 con respecto a niveles en una célula o muestra de control que también lleva la denominación de “nivel de referencia” o de “nivel de expresión de referencial”. Las expresiones “nivel de referencia”, “nivel de expresión de referencia”, “nivel de control” y “control” se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria descriptiva. Hablando en términos generales, la expresión “nivel de control” se refiere al nivel de una línea de base separada medida en una célula de control comparable, que por lo general está libre de enfermedad o de cáncer. Puede proceder del mismo individuo o de otro individuo que es normal o que no presenta la misma enfermedad que el individuo del cual se obtuvo la muestra enferma o la muestra de ensayo. Dentro del contexto de la presente invención, la expresión “nivel de referencia” se refiere a un “nivel de control” de expresión del CXCR4 utilizado para evaluar un nivel de ensayo de expresión de CXCR4 en una célula de cáncer que contiene una muestra de un paciente. Por ejemplo, cuando el nivel de CXCR4 en la muestra biológica de un paciente es superior al nivel de referencia de CXCR4, se considerará que las células tienen un elevado nivel de expresión, o una sobreexpresión de CXCR4. El nivel de referencia puede determinarse mediante una pluralidad de métodos. Por lo tanto, los niveles de referencia pueden definir células portadoras de CXCR4 o como alternativa el nivel de expresión de CXCR4 independientemente de la cantidad de células que expresan CXCR4. Por lo tanto, el nivel de referencia para cada paciente puede prescribirse mediante una relación de referencia del CXCR4, pudiéndose determinar la relación de referencia mediante cualquiera de los métodos para determinar los niveles de referencia descritos en la presente.

Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede tomar una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único, tal como un valor medio o un valor mediano. El “nivel de referencia” puede ser un número único, igualmente aplicable a cada paciente individualmente, o el nivel de referencia puede variar de acuerdo con subpoblaciones específicas de pacientes. Por lo tanto, por ejemplo, los hombres de mayor edad tiene un nivel de referencia diferente del de los hombres más jóvenes para el mismo cáncer, y las mujeres pueden tener un nivel de referencia diferente que de los hombres para el mismo cáncer. Como alternativa, es posible determinar el “nivel de referencia” midiendo en nivel de expresión de CXCR4 en células de cáncer no oncogénicas tomadas del mismo tejido que el tejido de células neoplásicas a ser ensayadas. De la misma manera, la expresión “nivel de referencia” puede referirse a una determinada relación de CXCR4 en las células neoplásicas de un paciente con respecto a los niveles de CXCR4 en células no tumorales dentro del mismo paciente. El “nivel de referencia” también puede ser el nivel de CXCR4 de células cultivadas in vitro, que pueda manipularse para simular células de tumor, o que pueden manipularse de cualquier otra manera que permite obtener niveles de expresión que de manera exacta determinen el nivel de referencia. Por otra parte, el “nivel de referencia” puede establecerse en base a grupo de comparación, tales como grupos que no tienen elevados niveles de CXCR4 y grupos que tienen elevados niveles de CXCR4. Otro ejemplo de grupo de comparación serían grupos que tienen una enfermedad, condición o síntomas particulares, y grupos sin la enfermedad. El valor predeterminado puede disponerse por ejemplo cuando una población ensayada se divide de manera igual (o de manera desigual) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de elevado riesgo, o en cuadrantes o quintiles, correspondiendo el cuadrante o quintil más bajo a individuos con el menor riesgo o la mayor cantidad de CXCR4 y correspondiendo el cuadrante o quintil más elevado a individuos con el mayor riesgo o con la menor cantidad de CXCR4.

También es posible determinar el nivel de referencia mediante la comparación del nivel de CXCR4 en poblaciones de pacientes que tienen el mismo cáncer. Esto puede llevarse a cabo por ejemplo mediante análisis de histograma, en el que se presenta gráficamente una cohorte entera de pacientes, y un primer eje representa el nivel de CXCR4, y un segundo nivel representa la cantidad de pacientes en la cohorte cuyas células tumorales expresan CXCR4 en un nivel dado. Es posible determinar dos o más grupos separados de pacientes mediante la identificación de poblaciones de subconjuntos de la cohorte que tienen niveles iguales o similares de CXCR4. Seguidamente puede efectuarse la determinación del nivel de referencia sobre la base de un nivel que mejor diferencie entre estos grupos separados. Un nivel de referencia puede también representar los niveles de dos o más marcadores, uno de los cuales es CXCR4. Es posible representar dos o más marcadores, por ejemplo, mediante una relación de valores para los niveles de cada marcador.

De la misma manera, una población aparentemente saludable tendrá un intervalo de valores “normales” diferente de la de una población de la que se sabe que tiene una condición asociada con la expresión del CXCR4. Por lo tanto, el valor predeterminado seleccionado puede tomar en cuenta la categoría en la cual recae un individuo. Es posible seleccionar intervalos y categorías adecuados mediante una simple experimentación rutinaria efectuada por las personas con la pericia habitual en la especialidad. Las expresiones “elevado”, “incrementado” se refieren a elevado con respecto a un control seleccionado. Típicamente, el control se basará en individuos normales aparentemente saludables en una escala de edades adecuada.

También debe entenderse que los controles de acuerdo con la invención pueden ser, adicionalmente a valores predeterminados, muestras de materiales ensayados en paralelo con los materiales experimentales. Los ejemplos incluyen tejido o células obtenidas al mismo tiempo y tomados del mismo sujeto, por ejemplo, partes de una biopsia individual, o partes de una muestra de células simple tomada del sujeto.

En el diagnóstico o supervisión clínicos de pacientes con enfermedades mediadas por CXCR4, la detección de las células que expresan CXCR4 o un incremento de los niveles de CXCR4, en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente tomada de un sujeto normal o de un tejido no canceroso, es por lo general indicativo de un paciente que tiene, o del que se sospecha que tiene, un trastorno mediado por CXCR4.

De acuerdo con lo que precede, la invención provee un método para predecir la sensibilidad al cáncer, que comprende detectar el nivel de expresión de CXCR4 en la muestra de un tejido, y su presencia indica una sensibilidad al cáncer, y el grado de la expresión de CXCR4 se refiere al grado de sensibilidad. Por lo tanto, en formas de realización específicas, se examina la expresión de CXCR4 en por ejemplo tejido de pecho, tejido de ovario, tejido de próstata, tejido de páncreas, tejido de piel, tejido de esófago, tejido de pulmón, tejido de cabeza y cuello, tejido de vejiga, tejido colorrectal, tejido de osteosarcoma, tejido de neuroblastoma, células de leucemia linfoblástica aguda, células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia mieloide crónica, células de leucemia linfocítica crónica, células de mieloma múltiple, células de linfoma, tejidos renales, tejido de glioblastoma, tejido tiroideo, tejido de rabdomiosarcoma, o de cualquier otro tejido del que se sospecha que tiene células que expresan CXCR4, y la presencia de CXCR4 en la muestra provee una indicación de una sensibilidad al cáncer o la emergencia o existencia de un tumor específico del tejido.

También se provee un método para evaluar la agresividad del tumor. En una forma de realización, un método para observar el avance de una condición maligna en un individuo a lo largo del tiempo, comprende determinar el nivel de CXCR4 expresado por las células en una muestra del tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de CXCR4 expresado en la muestra de un tejido equivalente tomado del mismo individuo en un momento distinto, y el grado de expresión de CXCR4 en la muestra del tumor a lo largo del tiempo provee una información acerca del avance o progresión del cáncer.

Y en otra forma de realización, la solicitud provee un método para determinar el protocolo terapéutico adecuado para un sujeto.

La presencia o ausencia o un cambio en el nivel de CXCR4 de acuerdo con invención puede ser una indicación de que es probable de que el sujeto tiene una recaída o un cáncer progresivo, o persistente, asociado con CXCR4. Por lo tanto, mediante la medición de un incremento de la cantidad de células que expresan CXCR4 o de los cambios en la concentración de CXCR4 presente en diversos tejidos células, es posible determinar si es efectivo un régimen terapéutico particular destinado a tratar una condición maligna asociado con CXCR4.

Otro sujeto de la invención es un método in vivo para formar imágenes de un trastorno oncogénico asociado con la expresión de CXCR4. Por ejemplo, es posible utilizar un método de este tipo sobre un paciente que presenta síntomas de un trastorno oncogénico. Si por ejemplo el paciente ha desarrollado por ejemplo niveles de expresión de CXCR4, entonces es probable que el paciente sufra de un trastorno y/o respuesta al tratamiento de pacientes que anteriormente habían tenido diagnóstico de un cáncer mediado por CXCR4. De acuerdo con el objetivo mencionado arriba, la invención provee un reactivo para formar imágenes en vivo que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferentemente etiquetado, especialmente radioetiquetado, y su utilización en la formación de imágenes de uso médico. Por lo tanto, un método general de acuerdo con la invención funciona administrando a un paciente una cantidad efectiva para la formación de imágenes de un reactivo formador de imágenes tales como el anticuerpo monoclonal arriba descrito que está etiquetado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y seguidamente se detecta el agente después de que se haya ligado al CXCR4 presente en la muestra. En determinadas formas de realización, el método funciona administrando una cantidad efectiva para la formación de imágenes de un agente formador de imágenes que comprende una parte de apuntamiento y una parte activa. El agente formador imágenes se administra en una cantidad efectiva para uso diagnóstico en un mamífero tal como un ser humano, y seguidamente se

detecta la localización y acumulación del agente formador de imágenes. La localización y acumulación del agente formador de imágenes puede detectarse mediante métodos de formación de imágenes por radionúclidos, radiocentellografía, formación de imágenes por resonancias magnética nuclear, tomografía computada, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computarizada, rayos X o formación de imágenes magnéticas, detección por fluorescencia, y detección quimioluminescente.

En cuanto al desarrollo de la terapia antitumoral apuntada, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas provee información in situ sobre el nivel de expresión del receptor, y por lo tanto permite seleccionar pacientes aptos en condiciones de ser tratados en función del nivel de expresión de los receptores necesario para un tratamiento de este tipo.

Para la inmunoterapia en la que se utilizan anticuerpos monoclonales, la respuesta al tratamiento depende del nivel de expresión apuntado para el receptor, tal como el tratamiento con trastuzumab donde la determinación de la sobreexpresión de Her2 en el carcinoma de pecho es actualmente de gran importancia clínica gracias a la aparición del anticuerpo monoclonal humanizado anti-Her2, trastuzumab. La demostración de la sobreexpresión de Her2 es un requisito preliminar para el tratamiento con trastuzumab ya que actúa por el hecho de apuntar específicamente a las células de carcinoma que sólo expresan Her2. Los ensayos exactos para Her2 tienen por objeto asegurar que el tratamiento con trastuzumab, costoso y potencialmente tóxico, no se aplique a pacientes con tumores no sobreexpresantes, y que cada paciente que podría beneficiarse con el trastuzumab reciba un tratamiento adecuado.

La enseñanza con el trastuzumab referido a la selección de los pacientes que sobreexpresaban Her2 mostró el beneficio de determinar el nivel de expresión del receptor cuando se utiliza una terapia con un anticuerpo monoclonal y de determinar, al mismo tiempo que un anticuerpo monoclonal terapéutico un anticuerpo monoclonal que pueda utilizarse para la selección de los pacientes.

Como consecuencia de ello, la invención se refiere a un proceso para determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho proceso los pasos siguientes: (1) determinar el nivel de expresión de CXCR4 como arriba descrito, (2) asignar un puntaje a dicho nivel de expresión del CXCR4, y (3) comparar dicho puntaje con el obtenido de una muestra de control.

Dentro del significado de la invención, la expresión "status del CXCR4" se refiere a la clasificación del tumor en una clase CXCR4 positiva [CXCR4 (+)] CXCR4 negativa [CXCR4 (-)] sobre la base de la determinación del nivel de expresión del gen CXCR4 medido mediante cualesquiera métodos tales como inmunohistoquímica (IHC), hibridación por fluorescencia in situ (FISH, fluorescence in situ hibridación), CISH (chromosome in situ hibridization, hibridación in situ por cromosomas), chip de genes u otros métodos conocidos por la persona con pericia en especialidad.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo para diagnóstico ha de ser capaz de ligarse al receptor apuntado cuando los tejidos se fijan mediante formalina, mediante Glyco-fixx, se embeben y/o congelan en parafina.

Más particularmente, el nivel de expresión de CXCR4 se mide mediante inmunohistoquímica (IHC).

A título de ejemplo, es posible asignar puntajes a las muestras en cuanto a los niveles de expresión de CXCR4 en una escala de 0–3+ para los niveles de teñido de anticuerpo, donde 0 es negativo y 1+–3+ representa teñido positivo en cuatro pasos semicuantitativos de intensidad creciente. Los puntajes 1+–3+ pueden recodificarse por cuanto cada puntaje positivo puede asociarse con un riesgo significativamente reducido, de recaída y de enfermedad fatal, en comparación con el puntaje 0 (negativo), pero un puntaje creciente entre los puntajes positivos puede proveer una reducción adicional de riesgo. Para estimar el valor de CXCR4 para pronóstico puede utilizarse cualquier método de análisis aleatorio convencional. Los métodos de análisis representativos incluyen el análisis de regresión de Cox, que es un método semiparamétrico para modelar los datos de supervivencia o de tiempo-a-acontecimiento en la presencia de casos

censurados (Hosmer y Lemeshow, 1999; Cox, 1972). A diferencia de otros análisis de supervivencia, por ejemplo las Life Tables o Kaplan–Meyer, el mtvd de Cox permite la inclusión de variables predictoras (covariantes) en los modelos. Mediante la utilización de un método de análisis convencional, por ejemplo, el método de Cox, sería posible probar hipótesis en cuanto a la correlación del status de expresión CXCR4 de una iniciación de tumor primario de cualquier enfermedad (tiempo de supervivencia libre de enfermedad, o tiempo para enfermedad de metástasis), o el tiempo hasta la muerte debido a la enfermedad (tiempo global de supervivencia). El análisis de regresión de Cox también se conoce como análisis aleatorio proporcional de Cox. Este método es estándar para ensayar el valor como pronosticador de un marcador de tumores, para estimar el tiempo de supervivencia de un paciente. Cuando se utiliza en modo multivariante, el efecto de varias covariantes se ensaya en paralelo de manera tal que sea posible identificar los marcadores individuales cuyo valor para el pronóstico sea independiente, es decir, se identifican los marcadores más útiles. La expresión “status de CXRX4” positivo o negativo [que también lleva la designación CXCR4 (+) o CXCR4 (–)] de los tumores se refiere a los puntajes 0 o a los puntajes 1+–3+, respectivamente.

Es posible asignar un “puntaje” a una muestra durante el diagnóstico o supervisión del cáncer de mama. En su forma simple, el puntaje puede ser categóricamente negativo o positivo en base al examen visual de las muestras por inmunohistoquímica. Un puntaje más cuantitativo implica juzgar la intensidad de dos parámetros de teñido y la proporción de células teñidas (positivas) que intervienen en el muestreo. Sobre la bases de estos dos parámetros es posible asignar números que reflejan niveles crecientes de teñido positivo. Allred et al (Allred, Harvey et al. 1998) han descrito una manera de lograr esto, que implica asignar puntajes a ambos parámetros sobre una escala de 0 (negativo) a 3+, y resumiéndose los puntajes de los parámetros individuales en un puntaje general. Esto tiene como resultado una escala con posibles puntajes 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. (Obsérvese que en la escala de Allred no es posible un puntaje igual a 1). Un

método de puntaje tanto más sencillo integra la intensidad del teñido nuclear y la proporción de células que presentan núcleos teñidos en forma de una escala combinada de 0 a 3+. Puede aplicarse cualquier método de puntaje a la intensidad del puntaje y la proporción del teñido de Stat5 activado en los núcleos de las células. Los términos positivo o negativo aplicados al "status de CXCR4" para los tumores, utilizados en la presente descripción, se refieren a niveles de expresión de CXCR4 que corresponden a puntajes 0 o 1+–3+ en la escala simplificada, respectivamente.

En términos generales, los resultados de un ensayo de acuerdo con la invención pueden presentarse en cualquiera de entre una variedad de formatos. Los resultados pueden presentarse de una manera cualitativa. Por ejemplo, el informe del ensayo puede indicar si se detectó si o no un polipéptido en particular, tal vez también con una indicación de los límites de detección. Los resultados pueden presentarse de una manera semicuantitativa. Por ejemplo, es posible definir varios intervalos, y es posible asignar un puntaje a los intervalos (por ejemplo, 1+ a 3+) que provea un determinado grado de información cuantitativa. Un puntaje de este tipo puede reflejar varios factores, por ejemplo la cantidad de células en las cuales se detectó el CXCR4, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión de las células portadoras de CXCR4 o de CXCR4), etc. Los resultados pueden presentarse de una manera cuantitativa, por ejemplo en forma de un porcentaje de células en las cuales se detectó el polipéptido (CXCR4), en forma de una concentración de proteínas, etc. Como comprenderá una persona con la pericia habitual en la especialidad, el tipo de salida provisto por un ensayo variará en función de las limitaciones técnicas del ensayo y de la significancia biológica asociada con la detección del polipéptidos. Por ejemplo, en el caso de determinados polipéptidos una salida puramente cualitativa (por ejemplo, si el polipéptido se detectó o no dentro de un determinado nivel de detección), provee información significativa. En otros casos, es necesaria una salida más cuantitativa (por ejemplo, una relación de los niveles de presión del polipéptido en la muestra que se está ensayando y el nivel normal).

En una forma de realización más preferida, el puntaje del nivel de expresión de CXCR4 está graduado entre 0 y 3+, sobre la base de una evaluación de la intensidad del producto de la reacción y el porcentaje de células positivas. Para mayor claridad, en la siguiente Tabla 5 se resumen estos parámetros. Solamente debe considerarse una reactividad membranosa circunferencial completa del tumor invasivo, y frecuentemente tiene un aspecto de “tejido de gallinero”. Bajo las directivas actuales, las muestras que tienen un puntaje como línea marginal (puntaje 2+ o más) para el CXCR4 IHC deben considerarse como CXCR4 (+) y es necesario que experimenten una mayor evaluación. El análisis de IHC debería ser rechazado, y o bien repetido o bien ensayado mediante FISCH o mediante cualquier método como si, a título de ejemplo no limitativo, los controles no son como se esperaba, los artefactos abarca la mayor parte de la muestra y la muestra tiene un fuerte carácter membranoso positivo de ductos pectorales normales (controles internos), lo que sugiere una recuperación excesiva de antígenos.

Tabla 5

Status de CXCR4	Descripción del IHC
0	No hay reactividad o reactividad membranosa en menos del 10% de las células de tumor
1+	Se detecta una reactividad membranosa débil/apenas perceptible en más del 10% de las células de tumor. Las células son inmunoreactivas solamente en parte de la membrana.
2+	Se observa una reactividad membranosa débil a moderada en más del 10% de las células de tumor.
3+	Se observa una fuerte reactividad completa en más del 10% de las células de tumor

En una forma de realización más preferida del proceso de acuerdo con la invención, dicho puntaje comprende la utilización de una escala adecuada sobre la base de dos parámetros que son la intensidad del teñido y el porcentaje de células positivas.

En una forma de realización preferida, el proceso de acuerdo con la invención, se refiere a una escala adecuada que es una escala de 0 a 3+ en la

cual la ausencia de reactividad membranoso de las células del tumor recibe un puntaje 0, y la reactividad fuerte completa en más del 10% de las células de tumor recibe un puntaje 3+.

Con mayor detalle, y como arriba descrito, dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la cual la ausencia de reactividad membranoso de las células de tumor recibe un puntaje 0; una reactividad membranoso débil perceptible en más de 10% de las células de tumor recibe un puntaje 1+; una reactividad membranoso completa moderada en más de 10% de las células de tumor recibe un puntaje 2+; y una reactividad completa fuerte en más de 10% de las células de tumor decide un puntaje 3+.

En un aspecto particular de la invención, un tumor es CXCR4 (+) con un puntaje de 2+.

En un aspecto particular de la invención, un tumor es CXCR4 (+) con un puntaje de 3+.

En otro aspecto particular de la invención, un tumor es CXCR4 (+) con un puntaje de 2+ o 3+.

De acuerdo con la invención, también se describe un proceso para determinar si un trastorno oncogénico es apto para su tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o con un fragmento o derivado del mismo, en el que dicho proceso comprende los pasos siguientes: (a) determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor de un sujeto, como arriba descrito; (b) determinar que, si el status es CXCR4 (+), el trastorno oncogénico es apto para su tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4, o con un fragmento o derivado del mismo.

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

Por razones de comodidad, una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas junto con instrucciones para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico, por ejemplo, kits, se halla también dentro de los alcances de la invención. El kit contiene los anticuerpos para la detección y cuantificación de

CXCR4 in vitro, por ejemplo en un ELISA o en un Western blot. El anticuerpo de la presente invención puede ser provisto en un kit para la detección y cuantificación de CXCR4 in vitro, por ejemplo en un ELISA o en un Western blot. Si el anticuerpo esta etiquetado con una enzima, el kit incluirá los substratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que provee el cromóforo o fluoróforo detectables). Adicionalmente puede haber otros aditivos incluidos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o un tampón de lisis) y similares. Un kit de este tipo puede incluir un receptáculo que tiene compartimentos para recibir uno o más contenedores tales como frascos, tubos y similares, y dichos contenedores contienen elementos separados de la invención. Por ejemplo, un contenedor puede contener un primer anticuerpo ligado a un vehículo o portador insoluble o parcialmente soluble. Un segundo contenedor puede tener un segundo anticuerpo soluble, etiquetado de manera detectable, en forma liofilizada o en solución. El receptáculo puede también contener un tercer contenedor que contiene un tercer anticuerpo, etiquetado de manera detectable, en forma liofilizada o en solución. Puede utilizarse con kits de estas características en el ensayo sándwich de la invención. La etiqueta o el inserto del empaque puede proveer una descripción de la composición así como también instrucciones para el uso in vitro previsto para el diagnóstico.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos puede variar ampliamente a efectos de proveer las concentraciones en solución de los reactivos que de manera sustancial optimicen la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proveerse en forma de polvos secos, usualmente liofilizados, lo que incluye excipientes que al disolverse proveerán una solución del reactivo que tiene la concentración adecuada.

Y en otro aspecto más de la invención, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos ligantes de los mismos, detallados en la presente, se proveen etiquetados con una parte detectable, de manera tal que es posible empacarlos y usarlos, por ejemplo en kits, para diagnosticar o identificar células que tienen el antígeno anteriormente mencionado. Los ejemplos, no limitantes de tales etiquetas

incluyen los fluoróforos tales como el isotiocianato de fluoresceína, cromóforos, radionúclidos, o enzimas. Tales anticuerpos etiquetados o fragmentos ligantes pueden utilizarse para la localización histológica del antígeno, ELISA, clasificación y selección de células, así como también otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar CXCR4, y células que llevan este antígeno, por ejemplo.

También se proveen kits que son útiles como un control positivo para ensayos de apoptosis, para la purificación o inmuno precipitación de CXCR4 a partir de células. Para la aislación y purificación de CXCR4, el kit puede contener los anticuerpos descritos en la presente o fragmentos ligantes de antígeno de los mismos acoplados a pellas (por ejemplo, pellas de sefarosa). Es posible proveer kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de CXCR4 in vitro, por ejemplo en un ELISA o en un Western blot. Lo mismo que con el artículo de manufactura, el kit comprende un contenedor y una etiqueta o inserto de empaque sobre o asociado con el contenedor. El contenedor contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-CXCR4 o fragmento ligante del mismo de la invención. Pueden incluirse contenedores adicionales que contienen por ejemplo diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o el inserto del empaque pueden proveer una descripción de la composición así como también instrucciones para el uso previsto in vitro para el diagnóstico.

Más particularmente, la invención se refiere a un kit para la determinación del status de CXCR4 de un tumor mediante cualquier método conocido de la persona con pericia en la especialidad. En una forma de realización preferida, y como se describirá en el ejemplo, la invención se refiere a un kit para la determinación del status de CXCR4 de un tumor mediante métodos de IHC.

En una forma de realización particular, la invención consiste en un kit que comprende por lo menos un anticuerpo anti-CXCR4, o un fragmento funcional o derivado del mismo, como descrito en lo que precede, siendo preferible que dicho anticuerpo esté etiquetado.

Debe entenderse que cualquier método de etiquetado puede ser utilizado por la persona con pericia en la especialidad, tales como, por ejemplo, la utilización de las etiquetas mencionadas arriba.

En una forma de realización preferida, el kit de acuerdo con la invención, útil para detectar in vitro la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa CXCR4 en un sujeto, comprende además un reactivo útil para detectar la amplitud de la ligación entre dicho anticuerpo anti-CXCR4 y el CXCR4.

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

Y en otra forma de realización, el kit de acuerdo con la invención útil para determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor, comprende además:

- i) un reactivo útil para detectar la amplitud de la ligación entre dicho anticuerpo etiquetado y CXCR4; y
- ii) muestras de control positivo y negativo útiles para asignar un puntaje al nivel de expresión del CXCR4.

Dicho kit para determinar in vitro el status de CXCR4 de un tumor puede además comprender un anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos; es preferible que dicho anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos esté etiquetado.

La invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un fármaco para apuntar específicamente a un compuesto que es biológicamente activo hacia células que expresan o sobre expresan CXCR4.

En el sentido de la presente memoria descriptiva, un “compuesto biológicamente activo” es cualquier compuesto capaz de modular, en especial de inhibir, la actividad celular, en especial el crecimiento, proliferación, transcripción y traducción de genes.

La invención también se refiere a un reactivo de diagnóstico *in vivo* compuesto de un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un fragmento funcional del mismo, preferentemente etiquetado, en especial radioetiquetado, y a su uso en formación de imágenes de uso médico, para la detección de un cáncer relacionado con la expresión o sobreexpresión celular de CXCR4.

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

Es preferible que dicha composición como producto de combinación o dicho conjugado se complementen con un excipiente y/o a vehículo farmacéutico.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "vehículo farmacéutico" se refiere a un compuesto, o a una combinación de compuestos, que ingresan en una composición farmacéutica, que no cause reacciones secundarias y que, por ejemplo facilite la administración de los compuestos activos, incremente su vida útil y/o efectividad en el organismo, eleve su solubilidad en solución o mejore su almacenamiento. Dichos vehículos farmacéuticos son bien conocidos y serán adaptados por una persona con pericia en la especialidad de acuerdo con la naturaleza y la vía de administración de los compuestos activos seleccionados.

Es preferible que tales compuestos se administren por vía sistémica, en especial por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea u oral. Es más preferible que la composición compuesta del anticuerpo de acuerdo con la invención sea administrada en varias dosis igualmente separadas a lo largo del tiempo.

Las vías de administración, los programas de dosificación, y las formas galénicas optimas pueden determinarse de acuerdo con los criterios generalmente tenidos en cuenta cuando se establece un tratamiento adecuado para un paciente tales como por ejemplo, la edad o peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, su tolerancia y los efectos secundarios experimentados.

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

apuntamiento específico de un compuesto que es biológicamente activo con respecto a células que expresan o sobreexpresan CXCR4.

Como se demostró en lo que precede, los CXCR4 Mabs de acuerdo con la invención presentan fuertes actividades en el campo del tratamiento del cáncer, por lo que sería posible utilizar tales anticuerpos en ensayos de preselección para la identificación de agentes antitumorales antagonistas de CXCR4 para tratar el cáncer. En el primer paso de estos ensayos, las células que expresan CXCR4 se incuban con los anticuerpos de la invención y seguidamente es posible evaluar las moléculas en cuanto a su capacidad potencial de inhibir anticuerpos. Las células utilizadas en este tipo de ensayos pueden ser cepas de células transfectadas tales como CHO–CXCR4, NIH3T3–CXCR4 o CXCR4 cepas de células humanas transfectadas tales como U373–MAGI–CXCR4, cepas de células transfectadas que expresan CXCR4 tales como NALM6 o células primarias tales como PBMC. El método utilizado para preseleccionar antagonistas de anticuerpos que inhiben CXCR4 que se ligan sobre células que expresan CXCR4 puede ser el ELISA (enzyme–linked immunosorbent Assay) competitivo basado en células descrito por Zhao Q. et al. (AIDS Research and Human Retroviruses, 2003, 19, pp947–955) o protocolos en los que se utiliza FACS (Fluorescence–Activated cell Sorting) tal como se describe en: Juárez J. et al. (Leukemia 2003, 17, pp1294–1300). : Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, se considera un proceso para la preselección y/o la identificación de moléculas como agentes antitumorales antagonistas de CXCR4, que comprende los pasos siguientes:

- a) seleccionar células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o con uno de sus fragmentos funcionales o derivados, de la invención, y
- c) evaluar las moléculas ensayadas para establecer su inhibición potencial sobre la ligación entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, con el CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

Otras características y ventajas de la invención, adicionales a las indicadas en la memoria descriptiva, aparecerán en los ejemplos y Figuras cuyas leyendas se presentan a continuación.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B muestran la expresión de CXCR4 y CXCR2 en células cancerosas por análisis de qPCR, respectivamente.

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

Las Figuras 3A y 3B muestran la competición de unión específica de [¹²⁵I]SDF1 por SDF-1 sin rotular (Figura 3A) y 515H7 Mab (Figura 3B) en membranas celulares de células CHO-K1 que expresan CXCR4 humana de tipo salvaje (T: unión total; NS: unión no específica).

La Figura 4 muestra la modulación de la activación de la proteína G por 515H7 Mab por control de respuestas de la unión de [³⁵S]GTPγS en el receptor de CXCR4 de tipo salvaje expresado establemente en células NIH-3T3.

La Figura 5 muestra la modulación de la activación de la proteína G por anti-CXCR4 Mab 515H7 por control de las respuestas de unión de [³⁵S]GTPγS en células tumorales humanas HeLa estimuladas con SDF-1 (10 y 100 nM).

Las Figuras 6A-6C muestran la modulación de la asociación del receptor de CXCR4 con diferentes pares de interacción por SDF-1 y por 515H7 Mab a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET) en células HEK293 (Figura 6A: homodimerización de CXCR4: CXCR4; Figura 6B: heterodimerización de CXCR2: CXCR4 y Figura 6C: reclutamiento mediado por CXCR4 de β-arrestina).

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

La Figura 8 muestra la modulación de la activación de la proteína G por anti-CXCR4 Mab 515H7 por control de las respuestas de unión de [^{35} S]GTP γ S en el receptor CXCR4 Asn¹¹⁹Ser mutante constitutivamente activo establemente expresado en células CHO-K1.

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

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

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

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

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

La Figura 14 muestra la competición de la unión específica de [^{125} I]SDF1 por m515H7 Mab murino y c515H7 Mab quimérico en membranas celulares de células CHO-K1 que expresan CXCR4 humana de tipo salvaje (T: unión total; NS: unión no específica).

La Figura 15 muestra la modulación de la activación de la proteína G por m515H7 Mab murino y por c515H7 Mab quimérico por control de las respuestas de la unión de [^{35} S]GTP γ S en el receptor de CXCR4 de tipo salvaje expresado establemente en células NIH-3T3 estimuladas con SDF-1 (10 nM).

La Figura 16 muestra la modulación de la activación de la proteína G por anti-CXCR4 m515H7 Mab murino y c515H7 Mab quimérico por control de las respuestas de unión de [^{35} S]GTP γ S en células tumorales humanas HeLa estimuladas con SDF-1 (10 nM).

Las Figuras 17A–17C muestran la modulación de la asociación del receptor de CXCR4 con diferentes pares de interacción por SDF–1 y por m515H7 y c515H7 Mabs a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET) en células HEK293. (Figura 17A: homodimerización de CXCR4:CXCR4; Figura 17B: heterodimerización de CXCR2:CXCR4 y Figuras 17C: reclutamiento mediado por CXCR4 de β –arrestina).

Las Figuras 18A y 18B muestran la inhibición de la liberación de calcio inducido por SDF–1 en células CHO–CXCR4 (Figura 18A) y en células U937 (Figura 18B).

La Figura 19 muestra la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF–1 por anti–CXCR4 Mabs m515H7 y c515H7 in vitro.

La Figura 20 muestra la actividad de Mab c515H7 anti–CXCR4 quimérico en el modelo de supervivencia de ratones U937 Nod/Scid.

La Figura 21 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada 515H7 con la línea germinal humana IGHV3–49*04 e IGHJ4*01. La secuencia de aminoácidos VH 515H7 está alineada con las secuencias marco aceptoras humanas seleccionadas. Las secuencias VH1 y VH2 (VH3 no está representada) corresponden a variantes humanizadas implementadas del dominio VH 515H7, con residuos retromutados en negrita. La variante 1 VH1 no lleva ningún residuo retromutado y representa una variante completamente humana. La variante VH2 tiene 8 retromutaciones y es la variante más murina. La variante VH3 lleva 5 retromutaciones (no representadas).

La Figura 22 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de 515H7 una cadena liviana con la línea germinal humana IGKV4–1*01 e IGKJ1*01. La secuencia de aminoácidos VL 515H7 está alineada con las secuencias marco aceptoras humanas seleccionadas. Las secuencias VL1 a VL3 corresponden a variantes humanizadas implementadas del dominio VL 515H7, con residuos remutados en negrita. La variante VL1 no lleva ningún residuo retromutado y

representa la variante más humana. La variante VL2 tiene 13 retromutaciones y es la variante más murina. La variante VL3 lleva 5 retromutaciones.

Las Figuras 23A–23F muestran el bloqueo cruzado del anticuerpo murino biotinilado 515H7 por 515H7 quimérico y diferentes variantes de 515H7 humanizado. La actividad de las variantes humanizadas de 515H7 (hz515H7) para bloquear de forma cruzada el anticuerpo murino principal 515H7 se evaluó por citometría de flujo usando células NIH3T3 transfectadas por CXCR4. La actividad de las variantes humanizadas se comparó con el 515H7 quimérico. La actividad de bloqueo cruzado de las tres diferentes variantes de VH (VH1 – VH3) combinadas con VL quimérica (cVL) era muy similar (Figura 23A – Figura 23C). No se determinó una reducción en la actividad de la variante 1 de VH (VH1, la variante sin retromutaciones) cuando se combinó con la variante 1 y 2 de VL. Se detectó una reducción significativa de la actividad para el constructo hz515H7 VH1 VL3.

La Figura 24 muestra el ensayo de BRET para evaluar la actividad de la variante de anticuerpo humanizado 515H7 VH1 VL1. La actividad de la variante humanizada 515H7 VH variante 1 VL variante 1 (hz515H7 VH1 VL1) se evaluó por su capacidad de inhibición de la transducción de señales mediada por SDF–1. Esta variante mostró sólo una menor inhibición de la transducción de señales mediada por SDF–1 tal como se determina por BRET. Se usó SDF–1 en una concentración de 100 nM.

Las Figuras 25A–25D muestran la comparación de diferentes mutantes de VH1 con retromutaciones simples o dobles y combinaciones de diferentes variantes de VL con hz515H7 VH1 D76N. Se efectuaron retromutaciones simples y dobles en VH1 y se combinaron con VL1. Estos constructos se evaluaron en ensayos de BRET (Figuras 25A–25C). De estas retromutaciones simples, sólo el constructo con la retromutación D76N mostró una mayor inhibición de la transducción de señales mediada por SDF–1. Ninguna de las dobles retromutantes en VH tenía una fuerte actividad de inhibición (Figura 25C). La

retromutante individual D76N de VH1 se combinó con diferentes variantes de VL. La concentración de SDF-1 era de 100 nM.

La Figura 26 muestra el ranking de diferentes mutantes de VH1 y VL1 con retromutaciones simples o dobles en comparación con el constructo VH1 D76N VL2. Las retromutaciones simples y dobles se realizaron en VH1 y se combinaron con VL1. Todos los constructos se evaluaron en ensayos de BRET y se calculó por porcentaje de inhibición. La concentración de SDF-1 era de 100 nM.

Las Figuras 27A–27B muestran inhibición de la unión de SDF-1 por diferentes constructos de 515H7 humanizado y la correlación entre el resultado obtenido por FACS y BRET. Las diferentes variantes del anticuerpo humanizado 515H7 con una fuerte actividad de bloqueo del reclutamiento de β -arrestina se ensayaron en su capacidad de inhibición de la unión de SDF-1 biotinilado en la citometría de flujo (FACS) (A). Se compararon con VH1 y VL1. Los resultados del ensayo en base a FACS se correlacionaron con los resultados obtenidos por BRET (B).

La Figura 28 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de VL2 hz515H7 y las versiones también humanizadas 515H7 VL2.1, 515H7 VL2.2 y 515H7 VL2.3. La secuencia de aminoácidos VL 515H7 está alineada con las secuencias marco aceptoras humanas seleccionadas. Las secuencias VL2.1, VL2.2 y VL2.3 corresponden a variantes humanizadas implementadas de 515H7 VL2 humanizada, con los residuos mutados en negrita. VL2.1 y VL2.2 llevan 4 residuos más humanizados, mientras que VL2.3 contiene otros 5 residuos humanos.

Las Figuras 29A–29C muestran Mabs humanizados 515H7 (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) que se unen específicamente a CXCR4 en NIH3T3–CXCR4 (Figura 29A) en células U937 (Figura 29B) y Ramos (Figura 29C).

Las Figuras 30A–30D y 31 muestran la modulación de la activación de la proteína G por Mabs 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2 [Fig. 30A],

hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [Fig. 30B], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [Fig. 30C] y hz515H7 VH1 D76N VL2.3 [Fig. 30D]) por control de las respuestas de unión de [^{35} S]GTP γ S en el receptor de CXCR4 de tipo salvaje expresado establemente en células NIH–3T3 estimuladas con SDF–1 (10 nM o 100 nM).

Las Figuras 32A–32C muestran la modulación de la asociación del receptor de CXCR4 con diferentes pares de interacción por SDF–1 y por Mabs 515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.3) a través de un enfoque de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET) en células HEK293 (Figura 32A: homodimerización de CXCR4:CXCR4; Figura 32B: heterodimerización de CXCR2:CXCR4 y Figura 32C: reclutamiento mediado por CXCR4 de β –arrestina).

Las Figuras 33A–33D ilustran tumores de xenoinjerto RAMOS y KARPAS299 fijados con Glyofixx con a) y c) tinción de IHC usando 515H7 / b) y d) tinción de IHC usando mlgG1.

Las Figuras 34A–34D ilustran tumores de xenoinjerto RAMOS y KARPAS299 fijados con Formol con a) y c) tinción de IHC usando 515H7 / b) y d) tinción de IHC usando mlgG1.

Las Figuras 35A–35D muestran la competición de unión de [^{125} I]SDF1 específico por Mabs hz515H7 humanizados (hz515H7 VH1 D76N VL2 [Figs. 35A & B], hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [Figs. 35A & 35C], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [Figs. 35A & 35D], hz 515H7 VH1 D76N VL2.3 [Fig. 35A]) en membranas celulares de células CHO–K1 que expresan CXCR4 humana de tipo salvaje (T: unión total ; NS: unión no específica).

La Figura 36 muestra la inhibición de la liberación de calcio inducido por SDF–1 en células U937 por hz515H7 VH1 D76N VL2 Mab.

Las Figuras 37A–37B muestran la inhibición de la migración de células U937 inducida por SDF–1 por Mab humanizado de CXCR4 hz515H7 VH1 D76N VL2 in vitro.

La Figura 38: tumores de xenoinjerto RAMOS y KARPAS299 fijados con Glyofixx con a) y c) tinción de IHC usando hz515H7 VH1 D76N VL2 biotinilados y b) y d) tinción de IHC usando hlgG1 biotinilado.

La Figura 39: tumores de xenoinjerto RAMOS y KARPAS299 fijados con Formol con a) y c) tinción de IHC de hz515H7 VH1 D76N VL2 biotinilados y b) y d) tinción de IHC de hlgG1 biotinilado. La Figura 40 muestra el efecto de Mab 515H7 quimérico (c515H7) en el crecimiento de tumor de xenoinjerto Ramos en células B en ratones Scid.

La Figura 41 muestra el efecto de la versión hz515H7 VH1 D76N VL2 Mab en el crecimiento de tumor de xenoinjerto Ramos en células B en ratones Scid.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de CXCR4 y de CXCR2 en células de cáncer

– análisis por Q-PCR:

A efectos de cuantificar la expresión relativa de CXCR4 y de CXCR2 en diferentes cepas de células cancerosas, se utilizó un RT-PCR en tiempo real.

Se extrajeron muestras de ARN de diferentes cepas de células, para lo cual se utilizaron Protocolos Mini o Midi (Qiagen Corporation, Francia). Seguidamente se controlaron las muestras de ARN mediante el sistema de electroforesis automatizado de Experion (BIO-RAD Corporation, Francia), y las mismas mostraron una buena calidad/integridad. Se convirtió un μg de cada muestra de ARN en templado cDNA, para lo cual se utilizó el kit de síntesis de Script cDNA (BIO-RAD Corporation, Francia). Se cuantificaron los niveles de cDNA mediante qPCR con sea una sonda TaqMan para CXCR2 sea SYBERGreen para CXCR4. La comparación de las muestras requiere una normalización, por lo que se introdujo la referencia interna RPL0. Las sondas TaqMan (utilizadas para CXCR2) llevaban una etiqueta informante 5' FAM y un grupo apagador o quencher 3'

TAMRA. Se activó la enzima de PCR, para lo cual se calentó durante 2 min a 50°C y durante 10 min a 95°C. Se utilizó un procedimiento de dos pasos, durante 15 seg a 95°C y durante 1 min a 62°C durante 40 o 45 ciclos en una mezcla de PCR que contenía 5 µl de templado de (dilución 1/20), 1 x qPCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems corporation, Branchburg New Jersey, EE.UU., de 50 a 900 nM de cada cebador y de 50 a 100 nM de sonda en un volumen total de 50 µl. Todas las reacciones se llevaron a cabo mediante el instrumento iCycler (BIO-RAD Corporation). Se permitió al Q-PCR determinar el umbral de Ciclo (Ct, Cycle threshold). Cuanto más pequeño sea el valor de Ct, tanto mayor es el grado en que se expresa el gen. Los cebadores y la sonda para la proteína Ribosomal Humana, grande, P0 fueron:

cebador directo, 5'-GAAACTCTGCATTCTCGCTTCCTG-3' (SEQ ID No.63);

cebador inverso, 5'-AGGACTCGTTTGTACCCGTTGA-3'(SEQ ID No.64);

sonda, 5'-(FAM)- TGCAGATTGGCTACCCAACTGTTGCA-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 65).

Los cebadores para CXCR4 Humano (receptor 4 de quimioquina) fueron:

cebador directo, 5'-CTCCTTCATCCTCCTGGAAATC-3' (SEQ ID No. 66);

cebador inverso, 5'-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-3' (SEQ ID No. 67).

Los cebadores y la sonda para CXCR2 Humano (receptor 2 de quimioquina) fueron:

cebador directo, 5'-GTGGTCATTATCTATGCCCTGG-3' (SEQ ID No. 68);

cebador inverso, 5'-CGACCCTGCTGTATAAGATGAC-3' (SEQ ID No.69);

sonda, 5'-(FAM)- TATTCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 70).

En nuestro estudio comparativo, se cuantificó la expresión de dos genes [el gen ensayado (CXCR4 o CXCR2) y RPL0]) en dos muestras diferentes: la cepa de células ensayada y una cepa de células de referencia. La cepa de células de referencia correspondía a la cepa de células que contenía la expresión más baja

del gen cuantificado. Se efectuó el cálculo de la expresión relativa del gen mediante la siguiente fórmula:

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

E_{gen} = eficiencia del PCR mediante los cebadores/sonda del gen cuantificado

E_{RPL0} = eficiencia del PCR mediante los cebadores/sonda RPL0

Ct = ciclo de umbral

$\Delta Ct(1) = Ct_{\text{gen}} (\text{cepa de células ensayada}) - Ct_{\text{gen}} (\text{cepa de células de referencia})$

$\Delta Ct(2) = Ct_{\text{RPL0}} (\text{cepa de células ensayada}) - Ct_{\text{RPL0}} (\text{cepa de células de referencia})$

Para cada serie de PCR se calculó un valor relativo de cantidad de gen, y se clasificaron las cepas de células de cáncer en grupos en base a sus niveles de expresión, del más alto al más bajo. Todos los datos han sido representados en las Figuras 1A y 1B. Todas las cepas de células de cáncer expresaron CXCR4 (Figura 1A) y CXCR2 salvo DU145 y U-87MG para CXCR2 (Figura 1B).

– *análisis por FACS:*

Se permeabilizaron cepas de células de cáncer MDA-MB-231, PC3 y U937 y seguidamente se las incubó con sea 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 [44717 (R&D Systems) en función de su control de isotipo IgG2b (SIGMA] sea con 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpos monoclonales anti-CXCR2 (anti h-CXCR2, clon 48311, R&D Systems, Mab 331 versus su control de isotipo IgG2a). Seguidamente se lavaron las células con BSA al 1%/PBS/NaN3 al 0,01 %. A continuación a las células se les añadieron anticuerpos secundarios etiquetados con Alexa, y se permitió su incubación a 4°C durante 20 min. A continuación se lavaron las células nuevamente, dos veces. Después del segundo lavado se llevó a cabo el análisis por FACS. Los resultados de estos estudios de ligación se han consignado en la Figura 2. Por lo tanto, las células tumorales tales como MDA-MB-231, PC3 y U937 expresaban ambas proteínas CXCR4 y CXCR2.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales (Mabs) contra CXCR4 humano

Para generar anticuerpos monoclonales contra CXCR4, se inmunizaron unos ratones Balb/c con células NIH3T3–CXCR4 recombinantes y/o péptidos correspondientes a los N-terminal y bucles extracelulares de CXCR4. Unos ratones de 6 – 16 semanas de edad en momentos de la primera inmunización, fueron inmunizados una vez con el antígeno en adyuvante completo de Freund por vía subcutánea (s.c.) seguido por 2 a 6 inmunizaciones con antígeno en adyuvante incompleto de Freund s.c. Se supervisó la inmunorrespuesta mediante sangrías retroorbitales. Se seleccionó el suero por ELISA (como se describe más adelante) y se utilizaron los ratones con las titulaciones más elevadas de anticuerpos anti–CXCR4 para las fusiones. Se reforzaron los ratones por vía intravenosa con antígeno dos días antes de su sacrificio y extirpación del bazo.

– ELISA

Para seleccionar los ratones que producen anticuerpos anti–CXCR4, se ensayaron los sueros tomados de ratones inmunizados, por ELISA. En pocas palabras, se recubrieron placas de microtitulación con péptido N-terminal purificado [1–41] conjugado con BSA a razón de 5 µg de péptido equivalente, 100 µL/depresión incubado a 4°C durante la noche, y seguidamente se bloqueó con 250 µL/depresión de gelatina al 0,5 % en PBS. Se añadieron diluciones de plasma tomado de ratones CXCR4–inmunizados en cada depresión y se sometió a incubación durante 2 horas a 37°C. Se lavaron las placas con PBS y seguidamente se las sometió a incubación con un anticuerpo IgG anti–ratón de cabra, conjugado a HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, se desarrollaron las placas con substrato de TMB, se detuvo la reacción 5 min después mediante la adición de 100 µL/depresión de 1M H₂SO₄. Los ratones que habían desarrollado las titulaciones más elevadas de anticuerpos anti–CXCR4 fueron utilizados para la generación de anticuerpos.

– Generación de hibridomas que producen Mabs contra CXCR4

Los esplenocitos de ratones, aislados de ratones Balb/c que habían desarrollado las titulaciones más elevadas de anticuerpos anti-CXCR4 fueron fusionados con PEG a una cepa de células de mieloma de ratón, Sp2/O. Se untaron las células sobre placas a razón de aproximadamente 1×10^5 /depresión en placas de microtitulación seguido por incubación durante dos semanas en un medio selectivo que contenía medio de ultra cultivo + L-glutamina 2 mM + piruvato de sodio 1 mM + 1x HAT. Seguidamente se seleccionaron las depresiones mediante ELISA para establecer la presencia de anticuerpos IgG monoclonales anti-CXCR4. Los hibridomas que segregan anticuerpos fueron seguidamente subclonados al menos dos veces mediante dilución limitante, cultivados *in vitro* a efectos de generara anticuerpos para análisis ulterior.

Ejemplo 3: Caracterización mediante análisis por FACS del carácter ligante específico para anti-CXCR4 Mab 515H7 y reconocimiento de cepas de células de cáncer

En este experimento se estudió la ligación específica al CXCR4 humano, de anti-CXCR4 Mab 515H7 mediante análisis de FACS.

Unas células NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4 transfectadas, cepas de células de cáncer MDA-MB-231, Hela y U937 fueron sometidas a incubación con 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal 515H7. Seguidamente se lavaron las células con BSA al 1%/PBS/NaN₃ al 0,01%. A continuación a las células se les añadieron anticuerpos secundarios etiquetados con Alexa, y se les permitió incubarse a 4°C durante 20 min. Seguidamente se lavaron las células nuevamente dos veces. Después del segundo lavado, se llevaron a cabo el análisis de FACS. Los resultados de estos estudios de ligación se proveen en la siguiente Tabla 6 que muestra [MFI (Mean Fluorescence Intensity, Intensidad Media de la Fluorescencia) obtenida por FACS] que el anti-CXCR4 Mab 515H7 se ligó específicamente a la cepa de células transfectadas de CXCR4-NIH3T3 humana, pero que no hubo reconocimiento sobre las células NIH3T3 progenitoras. Este Mab también fue capaz de reconocer cepas de células humanas cancerosas, por ejemplo células de cáncer de mama

MNDA–MB–231, células de cáncer promielocítico U937 y células de cáncer de cuello de útero Hela.

El Mab 515H7 anti–CXCR4 reconoció el transfectante NIH3T3–hCXCR4, pero no se reconocieron las células de tipo salvaje progenitoras NIH3T3. El Mab 515H7 también fue capaz de reconocer cepas de células de cáncer.

Tabla 6

Clon (10 µg/ml)	MFI sobre cepas de células				
	NIH3T3	NIH3T3–CXCR4	MDA–MB– 231	Hela	U937
515H7	16	2752	239	1851	645

Ejemplo 4: Ligazón de competición de Mab 515H7 anti–CXCR4 para [125I]SDF–1 en membranas CHO–K1 que expresan establemente el receptor de CXCR4 humano

Este ensayo permite evaluar la capacidad de 515H7 Mab para competir en la ligación de [125I]SDF–1 radio etiquetado con respecto al receptor de CXCR4 humano, en sitios de ligación ortostéricos o alostéricos.

Se obtuvieron células CHO–K1, que de manera estable y constitutiva expresaban el receptor de CXCR4 humano mediante la transfección de células CHO–K1 nativas (ATCC CCL–61) con un vector de expresión mamífero que llevaba la secuencia de codificación completa del receptor de CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Se propagaron las células en un medio de cultivo completo [DMEM–Ham’s F12 complementado con FCS (fetal calf serum, suero fetal de ternero al 5 %) y 500 µg/ml de geneticina]. Se llevaron a cabo experimentos de ligación de radioligando sobre membranas de células obtenidas en base a rascado mecánico de células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM] seguido por centrifugación (10000g, 15 min). Se llevó a cabo la ligación [125I]SDF–1 (actividad específica: 1.500 Ci/mmol) en base a la tecnología SPA (ensayo de proximidad por centelleo (ensayo de proximidad de centelleo)– GE Healthcare). En pocas palabras, se incubaron unas membranas de células (30

μg/depresión) en tampón ligante [Hepes 20mM, pH 7,4, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 5mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%] junto con compuesto para evaluar (SDF-1 o mAb), radioligando (1 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se llegó al equilibrio de ligación después de 1 h a 25 °C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). La ligación no específica se estimó en la presencia de 10 μM de SDF-1 sin etiquetar.

La dosis de SDF-1 sin etiquetar inhibió en función de la dosis la ligación de [¹²⁵I]SDF-1 con un valor pKi (IC₅₀ = concentración del ligando que permitía obtener una inhibición del 50 % de la ligación específica de [¹²⁵I]SDF-1) de 7,75 ± 0,27 nM (n = 4) (Figura 3A). Bajo las mismas condiciones experimentales, el 515H7 (100 nM) compitió eficientemente para la ligación [¹²⁵I]SDF-1 (% de inhibición de [¹²⁵I]SDF-1): (64 ± 300%) (Figura 3B).

Ejemplo 5: Modulación de la ligación de [³⁵S]GTP_γS en las membranas celulares que expresan el receptor de CXCR4 de tipo salvaje mediante anti-CXCR4 Mab 515H7

Este ensayo funcional permite supervisar la activación de la proteína G por intermedio del receptor de CXCR4 humano de tipo salvaje y su modulación por ligandos CXCR4 y 515H7 Mab.

Se obtuvieron células NIH-3T3 que de manera estable y constitutiva expresaban el receptor de CXCR4 de tipo salvaje, como arriba descrito para células CHO-K1. Unas células HeLa (carcinoma de cuello de útero humano) células fueron propagadas en medio de cultivo completo [EMEM complementado con FCS al 10%, L-glutamina al 1%, 2 μ de carbonato de sodio]. Se llevó a cabo la ligación de [³⁵S]GTP_γS sobre membranas celulares obtenidas mediante rascado mecánico en tampón de lisis [Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM] seguido por centrifugación (10.000 g, 15 min). La incorporación y detección de [³⁵S]GTP_γS (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) fue llevada a cabo mediante la tecnología de SPA technology (ensayo de proximidad por centelleo, ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (10

μg/depresión) fueron sometidas a incubación en tampón de ligación [Hepes 20mM, GDP 3μM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH=7.4] junto con compuesto a efectos de evaluar (SDF-1 o Mab de interés), [³⁵S]GTPγS (0,2–0,4 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se llevó a cabo la reacción de ligación durante 1 hora a 25°C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calculó la potencia antagonista mediante la aplicación de la Ecuación de Cheng Prusoff:

$K_B = [\text{conc antago}] / \{ (EC_{50} / EC_{50}') - 1 \}$ donde EC₅₀ y EC_{50'} son respectivamente la potencia de SDF-1 en la ausencia y presencia de mAb.

El SDF-1 indujo un incremento, dependiente de la distancia, de la ligación de [³⁵S]GTPγS, como resultado de la activación de la proteína G por el receptor de CXCR4. La estimulación máxima de la ligación de [³⁵S]GTPγS representa respectivamente 67 % y 320 % sobre la ligación de base del [³⁵S]GTPγS para HeLa y las membranas de células NIH3T3/CXCR4. La potencia de SDF-1 fue similar para ambas cepas de células y correspondió a 41,3 ± 9,7 nM (Figura 4). Bajo estas condiciones experimentales, la potencia antagonista de 515H7 Mab, determinada en las células CXCR4, era de 15 nM. Se observó una eficacia antagonista similar para las células HeLa células (Figura 5).

Ejemplo 6: Asociación de CXCR4 con diferentes patrones de interacción: homo y heterodimerización, reclutamiento de β-arrestina por intermedio de un enfoque de BRET (bioluminescence resonance energy transfer, transferencia de energía de resonancia por bioluminiscencia) y efecto del 515H7 Mab sobre estos dímeros

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios de conformación inducidos por la ligación de SDF-1 y/o 515H7 Mab sobre el receptor de CXCR4 a nivel de la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4 así como del reclutamiento de la proteína de señalización de β-arrestina-2.

Se construyeron vectores de expresión para cada uno de los miembros investigados que intervienen en la interacción como proteínas de fusión con el

tinte correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, proteína fluorescente Rluc y Yellow, YFP) mediante la aplicación de técnicas convencionales de biología molecular. Dos días antes de la realización de los experimentos de BRET, se transfectaron células HEK293 con vectores de expresión que codifican los correspondientes miembros que intervienen en el BRET [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] a efectos de estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4/Rluc + CXCR2:YFP] a efectos de estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4/Rluc + β -arr2:YFP] para estudiar la del reclutamiento, mediado por CXCR4, de la β -arrestina-2. Al día siguiente se distribuyeron las células sobre 96 placas MW blancas preredidas con polilisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con FBS al 10%]. Se empezó a cultivar las células a 37°C con CO₂ al 5 % a efectos de permitir la fijación de las células a la placa. Seguidamente se privó a las células de alimento con 200 μ l DMEM/depresión durante la noche. Inmediatamente antes del experimento de BRET, se retiró el DMEM y se lavaron las células rápidamente con PBS. Seguidamente se incubaron las células en PBS en la presencia o ausencia de anticuerpo, durante 10 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 300 nM hasta un volumen final de 50 μ l. Después de incubación durante otros 10 minutos a 37°C, se inició la adquisición de la emisión a la luz X a 485 nm y 530 nm para lo cual se utilizó la lectora Mithras LB940 multilabel reader (Berthold) (1 s/longitud de onda/depresión repetidos 15 veces a la temperatura ambiente).

El cálculo de la relación del BRET se llevó a cabo como anteriormente descrito (Angers et al., 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc solamente bajo las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación muestra que la relación de BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando todos miembros intervinientes del BRET se hallan presentes, corregido mediante la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solamente el miembro fusionado al Rluc se halla presente en el ensayo. Por razones de legibilidad, los resultados se

expresan en unidades milliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación de BRET multiplicado por 1.000.

El SDF1 (300 nM) aumentó en aproximadamente 20% la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas adaptadora y receptora fusionadas al receptor de CXCR4 receptor; es probable que esto indique la formación de homo dímeros CXCR4/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (Figura 6A). Es interesante observar que el SDF1 (300 nM) disminuyó en aproximadamente el 24 % la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas adaptadora y aceptora fusionadas a CXCR2 y CXCR4, y es probable que esto indique la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 así como cambios conformacionales de dímeros preexistentes (Figura 6B). En este último caso, parece que la conformación, activada por SDF-1, de CXCR4/CXCR2 parece ser menos favorable para la transferencia de energía del BRET. En ambos casos el 515H7 Mab fue capaz de modular cambios conformacionales, inducidos por SDF-1, para los homodímeros CXCR4 (inhibición del 69%, inducido por SDF-1, del incremento del BRET, Figura 6A) así como para la formación del heterodímero CXCR2/CXCR4 (90 % de inhibición de la disminución, inducida por SDF-1, del BRET para 515H7, Figura 6B). 515H7 El Mab fue también capaz de modular por sí mismo la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de 515H7 Mab sobre la conformación del homodímero CXCR4/CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4 (Figuras 6A y 6B).

La activación de CXCR4 por el SDF-1 (300 nM) permitió obtener un fuerte reclutamiento de la molécula de señalización intercelular β -arrestina, como se demuestra mediante el refuerzo del 233 % en la señal de BRET (Figura 6C). Este reclutamiento estuvo parcialmente inhibido por 515H7 Mab (aproximadamente 95 %, Figura 6C) lo que demuestra el efecto de 515H7 sobre la señalización.

Ejemplo 7: inhibición, mediada por CXCR4, de la producción de cAMP

Se diseñó este ensayo funcional para supervisar la señalización del receptor de CXCR4 receptor a nivel de las adenilato ciclasas por intermedio de las proteínas inhibidoras Gi/o.

Se aplicó el procedimiento cAMP LANCE (Perkin Elmer), de acuerdo con lo detallado por el proveedor. En pocas palabras, se obtuvieron unas células NIH3T3 que de manera estable y constitutiva expresaban el receptor de CXCR4 del tipo salvaje, y se las propagó como arriba descrito. Se recolectaron las células, para lo cual se utilizó el agente Versene libre de tripsina, y se las resuspendió con una concentración de 10^6 células/ml en una solución que contenía el anti cAMP Mab AlexaFluor-bound (dilución: 1/100) y el compuesto (forskolin, SDF-1 y/o 515H7 Mab). Durante la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron la mezcla de detección que contenía Europium-Streptavidin (dilución 1/125th) y los complejos Biotin-cAMP (dilución: 1/125). Durante la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se midió la señal FRET resultante en una lectora Mithras LB940 (Berthold) multilabel reader. Los datos se expresaron como valores de fluorescencia arbitrarios o como estimulación relativa vs la respuesta de SDF-1 mediante sustracción del efecto FKt.

El forskolin (FK) estimuló, en función de la dosis, la producción de cAMP con una potencia de aproximadamente 0,3 μ M en células NIH3T3/CXCR4 (Figura 7A). En la presencia conjunta de SDF-1, los niveles de cAMP intracelulares disminuyeron como resultado de la activación de la proteína inhibidora Gi/o por el receptor de CXCR4. La potencia del SDF-1 era de $5,0 \pm 3,1$ nM (Figura 7A). El 515H7 Mab inhibió de manera eficiente el efecto, estimulado por forskolin, del SDF-1 (100 nM) en más del 80% (Figura 7B).

Ejemplo 8: Modulación de la ligación de [³⁵S]GTP γ S en las membranas celulares que expresan de manera constitutiva el receptor del mutante, constitutivamente activo, Asn¹¹⁹Ser CXCR4 por el Mab 515H7

Este ensayo funcional permite supervisar la activación de la proteína G por intermedio de un mutante constitutivamente activo (CAM, constitutively active mutant), receptor Asn¹¹⁹Ser CXCR4 (véase Zhang et al., 2002). Este ensayo

sensible permite discriminar los ligandos CXCR4 sobre la base de su actividad intrínseca (agonista parcial, antagonista silencioso o agonista inverso). Como anteriormente descrito por Zhang y colegas, los ligantes de CXCR4 tales como AMD3100 o T140 se comportaron respectivamente como agonista parcial y agonista inverso en el receptor de CAM CXCR4. La identificación del antagonista silencioso puede ser difícil ya que es necesario que esta clase de molécula presente afinidades similares tanto para el estado activo como inactivo del CXCR4 (Wurch et al., 1999).

La introducción de una mutación de Asn119Ser en la secuencia de codificación del receptor de CXCR4 receptor fue llevada a cabo mediante la aplicación de técnicas convencionales de biología molecular (kit de mutagénesis dirigido a sitio de cambio rápido, QuickChange site directed mutagenesis kit, Stratagene US). Se obtuvieron células CHO-K1 que de manera estable y constitutiva expresaban el receptor CAM CXCR4, como se describió en el ejemplo precedente. Se llevó a cabo la ligación de [^{35}S]GTP γ S sobre membranas celulares obtenidas mediante rascado mecánico en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM], seguido por centrifugación (10.000 g, 15 min). Se llevó a cabo la incorporación de [^{35}S]GTP γ S (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) mediante la tecnología SPA technology (ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (10 μg /depresión) fueron sometidas a incubación en tampón ligante [Hepes 20 mM, GDP 3 μM , MgCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, pH = 7,4] junto con compuesto para evaluar (SDF-1 o mAb), [^{35}S]GTP γ S (0.2–0.4 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se llevó a cabo la reacción de ligación durante 1 hora a 25°C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer).

El SDF-1 (100 nM) estimuló la ligación de [^{35}S]GTP γ S en 130 %. El agonista inverso T140 inhibió la ligación tanto de base (– 17 %) como la ligación de [^{35}S]GTP γ S estimulada por SDF-1 (– 159 %). En cambio, el 515H7 se comportó como antagonista silencioso en el CAM CXCR4, sin alterar la ligación de

[³⁵S]GTP γ S de base (Figura 8) pero inhibió la ligación de [³⁵S]GTP γ S inducida por SDF-1 (Figura 8).

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

Para evaluar el efecto inhibitor del anticuerpo monoclonal 515H17 anti-CXCR4 sobre el proceso de la migración, 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 2%, fueron aplicadas como recubrimiento en la cámara superior de cámaras de migración (placas de 24 depresiones, tamaño de los poros: 8 μ m) sea en la presencia sea en la ausencia de SDF-1 en la parte inferior de las depresiones y con o sin Mab 515H7 en la cámara superior. En este ensayo se introdujo IgG2b murino como control de isótopo. Dos horas después de la aplicación como placa, se contaron las células migrantes. Los resultados presentados en las Figura 9 demostraron que, como era de prever el SDF-1 fue capaz de inducir un incremento significativo de la migración de las células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células fueron sometidas a incubación con el control de isotipo de IgG2b. En cambio, para las células encubadas con el 515H7 Mab, se observó una disminución significativa y reproducible en la migración, inducida por el SDF-1, de las células U937.

Ejemplo 10: Inhibición de Anti-CXCR4 Mab 515H7 del desarrollo de tumores de xenoinjerto MDA-MB-231 en ratones Nod/Scid

El objetivo de estos experimentos era el de evaluar la capacidad de anti-CXCR4 Mab 515H7 para inhibir el crecimiento de xenoinjerto de MDB-MB-231 en ratones Nod/SCID.

Se cultivaron de manera rutinaria unas células MDA-MB-231 de ECACC en medio DMEM (Invitrogen Corporation, Scotland, RU), FCS al 10% (Sigma, St Louis MD, USA). Las células fueron divididas a las 48 horas antes del injerto de manera tal que se hallaban en la fase exponencial de su crecimiento. Se injertaron diez millones de células MDA-MB-231 en PBS a ratones Nod/Scid de siete semanas de edad (Charles River, Francia). Cinco días después de la implantación pudieron medirse los tumores ($34 \text{ mm}^3 < V^3 < 40 \text{ mm}^3$) y se dividieron los animales

en grupos de 6 ratones con tumores de tamaño comparable. Los ratones fueron tratados i.p. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de Mab 515H7.

Seguidamente los ratones recibieron inyecciones por semana una dosis de 0,5 mg/dosis/ratón de Mab 515H7 tres veces por semana. En este experimento se introdujo un grupo PBS como grupo de control. Se midió el tamaño del tumor dos veces por semana, y se calculó mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en cada medición mediante un ensayo de Mann–Whitney.

En estos experimentos no se observó ninguna mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo PBS, hubo una inhibición significativa en el crecimiento del tumor entre los días D7 y D39 ($p \leq 0.002$) para 515H7 0,5 mg/dosis, y el volumen promedio del tumor después de 5 semanas de tratamiento, se redujo en 50 % con respecto al PBS para Mab 515H7 (Figura 10).

Ejemplo 11: Movilización, mediada por el receptor de CXCR4, de las reservas de calcio intracelular

Este ensayo tuvo por objeto supervisar la señalización del receptor de CXCR4 por intermedio de la estimulación de la trayectoria de la fosfolipasa C, que induce la liberación de calcio desde las reservas intracelulares del retículo endoplásmico.

Se obtuvieron células CHO–K1 que de manera estable y constitutiva expresan el receptor de CXCR4 de tipo salvaje, como se describió en el ejemplo precedente. Unas células MDA–MB–231 (adenocarcinoma de pecho humano) y U937 (leucemia humana) fueron propagadas en medio de cultivo completo, o bien [DMEM complementado con FCS al 10%] y [RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, una solución de aminoácido no esencial al 1%, piruvato de sodio al 1%, L–glutamina al 1%, 4,5 g/l de glucosa]. Todos los tipos de células fueron untadas en placas negras de 96 MW con una densidad de 100.000 células/depresión en un medio de cultivo adecuado. Las células fueron privadas de alimento antes de llevarse a cabo los experimentos. Las células fueron cargadas con tinte de calcio fluorescente (Fluo–4 No Wash, Invitrogen US) in

tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido Probenicid 25 mM] durante 30 min. a 37 °C seguido por 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 se llevó a cabo mediante inyección directa en cada depresión. Para los experimentos de antagonismo, se añadieron 10 µl de solución de Mab directamente en el tampón de carga al menos 10 minutos antes del SDF-1. Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia cinética en una lectora de microplacas de fluorescencia multi-modo Mithras LB940 (Berthold) para lo cual se utilizaron los siguientes ajustes: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada depresión durante cada 0,1 segundo y durante un intervalo de tiempo de 20 seg antes de la inyección de SDF-1 (señal de base). A continuación se inyectaron 20 µl de SDF-1 y se registraron los datos seguido por un intervalo de tiempo de 2 min. Cada condición experimental se llevó a cabo por duplicado. Los valores para cada depresión se corrigen primero restando la fluorescencia de base y la fluorescencia emitida por una depresión de control sin células. Los datos relativos se expresaron como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

El SDF1 (100 nM) indujo una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en CHO/CXCR4 recombinante, no observándose ninguna señal de fluorescencia en las células CHO-K1 nativas. La intensidad máxima llegó a > 160 % con respecto a la fluorescencia de base y se observó a aproximadamente 30 sec de la estimulación mediante SDF-1, se observaron curvas cinética similares tanto con MDA-MB-231 como con U-937 (Figuras 11A, 11B, 11C), si bien la densidad máxima de la fluorescencia por SDF-1 (100 nM) fue inferior (130–140 % con respecto al valor de base). El anticuerpo 515H7 (133 nM) resultó en una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio inducida por SDF-1 (100 nM) en la totalidad de las tres cepas de células investigadas.

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

Unas células U937 de ATCC fueron cultivadas en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina al 1%. Se dividieron las células dos días antes del injerto de

manera tal que se hallaban en su fase exponencial de crecimiento. Se inyectaron 10 millones de células U937 por i.p. a ratones NOD/SCID hembra. Dos días después de la implantación, los ratones fueron tratados s.c. con una dosis de carga de 2 mg de 515H7 Mab/ratón y a continuación dos veces por semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones de control recibieron inyecciones de PBS, ya que los estudios interiores habían indicado que no se observaba una diferencia en supervivencia entre ratones que habían recibido inyecciones de PBS y ratones a los que se había administrado un control de isotipo IgG de ratón. Se supervisó día por día la supervivencia de los ratones.

Los resultados descritos en la Figura 12 muestran que los ratones tratados con 515H7 Mab tuvieron un incremento drástico y significativo de vida con T/C% aproximadamente 280 para 515H7 Mab (Figura 12).

Ejemplo 13: Inhibición de anti-CXCR4 Mab 515H7 del crecimiento tumoral de xenoinjerto de células T KARPAS 299 en ratones Nod/Scid

El objetivo de este experimento es el de evaluar la capacidad de anti-CXCR4 Mab 515H7 de inhibir el desarrollo de xenoinjerto KARPAS 299 en ratones Nod/Scid.

Una células KARPAS 299 de ECACC fueron cultivadas de manera rutinaria en medio RPMI, L-Glu al 1% y FCS al 10% (Sigma, St Louis MD, USA). Se dividieron las células 48 horas antes del injerto, de manera que se hallaban en su fase exponencial de crecimiento. Se injertaron 5 millones de células KARPAS 299 células en PBS a ratones Nod/SCID de 7 semanas de edad (Charles River, Francia). Cinco días después de la implantación pudieron medirse los tumores ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) y los animales fueron divididos en grupos de seis ratones con tumores de tamaños comparables. Los ratones fueron tratados i.p. con una dosis de carga de 2 mg/ratón de Mab 515H7.

A continuación, a los ratones se les inyectó dos veces por semana 1 mg/dosis/ratón de Mab 515H7. En este experimento se introdujo un grupo de PBS como grupo de control. Se midieron los volúmenes de los tumores dos veces por semana, y se los calculó mediante la siguiente fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times$

altura. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos en cada medición, por lo cual se utilizó un ensayo de Mann–Whitney.

En estos experimentos no se observó ninguna mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo PBS, hubo una inhibición significativa del crecimiento de los tumores entre los días D7 y D33 ($p \leq 0.002$) para 515H7 Mab 1 mg/dosis y se redujo el volumen promedio de los tumores después de cinco semanas de tratamiento en un 63% para Mab 515H7 en comparación con PBS (Figura 13).

Ejemplo 14: Producción de Mab c515H7 quimérico anti CXCR4

Se diseñaron formatos quiméricos de 515H7 Mab murino: corresponde a los dominios variables de cadena liviana y pesada del anticuerpo murino de interés, fusionado genéticamente a los dominios constantes Ckappa y IgG1 humanos. Se produjo Mab recombinante mediante transfección transitoria, para lo cual se utilizó el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, US).

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los dominios variables de cadenas livianas y pesadas de 515H7 Mab fueron sintetizadas mediante síntesis global de genes (Genecust, Luxemburgo). Fueron subclonadas en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) que llevaba la secuencia codificador entera del dominio constante de sea la cadena liviana [Ckappa] se la cadena pesada [CH1–Hinge–CH2–CH3] la inmunoglobulina IgG1 humana. Todos los pasos de clonación fueron llevados a cabo de acuerdo con técnicas convencionales de biología molecular como se describió en: the Laboratory Manual (Sambrook y Russel, 2001) o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada constructor genético fue validado por completo mediante secuenciado de nucleótidos para lo cual se utilizó el kit del secuenciado de ciclos de terminador por teñido (Dye terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems, US) y analizado mediante un analizador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).

Unas células de células HEK293 EBNA adaptadas en suspensión (InVitrogen, US) fueron cultivadas de manera rutinaria en frascos de 250 ml en 50 ml de Excell 293 libre de suero (SAFC Biosciences) complementado con glutamina

6 mM sobre un dispositivo vibrador orbital (velocidad de rotación: 110 rpm). Se llevó a cabo la transfección transitoria con $2 \cdot 10^6$ células/ml para lo cual se utilizó polietilenimina lineal de 25 kDA (PEI) (Polysciences) preparado en agua con una concentración final de 1 mg/ml mezclado y ADN de plásmido (concentración final de 1,25 μ g/ml para una relación entre cadena pesada y liviana de 1:1). A las 4 horas después de la transfección, se diluyó el cultivo con un volumen del medio de cultivo fresco de manera de lograr una densidad final de las células de 10^6 células/ml. El proceso de cultivo fue supervisado sobre la base de la viabilidad de las células y de la producción de Mab. Típicamente, se mantuvieron los cultivos durante cuatro a cinco días. Se purificó el Mab mediante un foco de cromatografía convencional sobre una resina proteína A (GE Healthcare, EE.UU.). Se produjo el Mab con niveles adecuados para evaluaciones funcionales. Típicamente, los niveles de productividad varían entre 6 y 15 mg/l de Mab purificado.

Ejemplo 15: Caracterización mediante análisis FACS del carácter específico de ligación de Mab c515H7 quiméricos anti-CXCR4 y reconocimiento de la cepa de células de cáncer

En este experimento, mediante análisis FACS se estudió la ligación específica de Mab c515H7 quimérico anti-CXCR4 al CXCR4 humano.

Unas células NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4 transfectadas y una cepa de células de cáncer MDA-MB-231 fueron sometidas a incubación con 10 μ g/mL de anticuerpos monoclonal c515H7. Las células fueron seguidamente lavadas con BSA al 1%/PBS/NaN₃ al 0,01%. Seguidamente, a las células se les añadieron anticuerpos secundarios Alexa-etiquetados, y se les permitió incubarse a 4°C durante 20 min. A continuación se lavaron las células nuevamente dos veces. Después del segundo lavado se llevó a cabo el análisis FACS. Los resultados de estos estudios de ligación se han resumido en la siguiente Tabla 7 que muestra [MFI; Mean Fluorescence Intensity, Intensidad Media de la Fluorescencia) obtenida mediante FACS] que el Mab c515H7 quimérico anti-CXCR4 se liga específicamente a la cepa de células CXCR4-NIH3T3 humana transfectadas y

también reconoce cepas de células de cáncer humano, por ejemplo células de cáncer de mama MDA–MB–231.

Mab (10 µg/ml)	MFI sobre cepas de células	
	NIH3T3–CXCR4	MDA–MB–231
C515H7	2294	118

Ejemplo 16: Ligazón de competición de Mab m515H7 murino anti–CXCR4 y de Mab c515H7 quimérico por [¹²⁵I]SDF–1 en membranas CHO–K1 que de estable expresan el receptor de CXCR4 humano

Este ensayo permite evaluar la capacidad del Mab m515H7 murino y del Mab c515H7 quimérico para ligar el [¹²⁵I]SDF–1 radioetiquetado al receptor CXCR4 humano, en sitios de ligación sea ortostérico sea alostérico.

Se obtuvieron unas células CHO–K1 que de manera estable y constitutiva expresan el receptor de CXCR4 humano mediante la transfección de células CHO–K1 nativas (ATCC CCL–61) con un vector de expresión mamífero que lleva la totalidad de la secuencia codificadora del receptor de CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Las células fueron propagadas en medio de cultivo completo [DMEM–Ham’s F12 complementado con suero fetal de ternero al 5% (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Se llevaron a cabo experimentos de ligación de radioligando sobre membranas de células obtenidas mediante rascado mecánico de células CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7.4, NaCl 150mM] seguido por centrifugación (10.000g, 15 min). Se llevó a cabo la ligación de [¹²⁵I]SDF–1 (actividad específica: 1,500 Ci/mmol) mediante la tecnología de SPA (ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (30 µg/depresión) fueron sometidas a incubación en tampón de ligación [Hepes 20mM, pH 7.4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%] junto con compuesto para evaluar (SDF–1 o mAb), radioligando (1 nM) y finalmente pellas de SPA–WGA–PVT (7,3 mg/depresión). Se llegó al equilibrio de ligación después de 1 H a 25 °C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin

Elmer). Se estimó la ligación no específica (NS, non-specific) en la presencia de 1 μ M de SDF-1 no etiquetado.

Los Mabs anti-CXCR4 (100 nM) competieron eficientemente por la ligación de [^{125} I]SDF-1 con el siguiente orden de rango en cuanto a eficacia en la competición (inhibición porcentual de [^{125} I]SDF-1): m515H7 ($62 \pm 10\%$) y c515H7 ($55 \pm 4\%$) (Figura 14).

Ejemplo 17: Modulación de ligación de [^{35} S]GTP γ S en membranas celulares que expresan receptor de CXCR4 del tipo salvaje por Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y Mab c515H7 quimérico

Este ensayo funcional permite supervisar la activación de la proteína G por intermedio del receptor de CXCR4 humano del tipo salvaje y su modulación por Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y Mab c515H7 quimérico.

Se obtuvieron unas células NIH-3T3 que de manera estable y constitutiva expresan el receptor de CXCR4 de tipo salvaje, como se describió en el ejemplo precedente para las células CHO-K1. Unas células HeLa (carcinoma del cuello de útero humano) fueron propagadas en medio de cultivo completo [EMEM complementado con FCS al 10%, glutamina L al 1%, bicarbonato de sodio 2 μ M]. Se llevó a cabo la ligación de [^{35} S]GTP γ S sobre membranas celulares obtenidas mediante rascado mecánico en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM] y con una centrifugación adicional (10.000 g, 15 min). Se llevó a cabo la incorporación y detección de [^{35} S]GTP γ S (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) mediante la utilización de la tecnología SPA (ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (10 μ g/depresión) fueron sometidas a incubación en tampón de ligación [Hepes 20mM, GDP 3 μ M, MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH=7,4] junto con compuesto para evaluar (SDF-1 y Mab de interés), [^{35} S]GTP γ S (0.2–0.4 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se llevó a cabo la reacción de ligación durante una hora a 25 °C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calcularon los IC₅₀ para cada Mab.

Bajo estas condiciones experimentales, los IC_{50} de los Mabs m515H7 y c515H7, determinados en células NIH3T3/CXCR4 eran de 1,9 nM y 1,5 nM, respectivamente (Figura 15). El IC_{50} de los Mabs m515H7 y c515H7 determinados mediante células Hela bajo las mismas condiciones experimentales eran de 0,2 nM y 0.6 nM, respectivamente (Figura 16).

Ejemplo 18: Asociación de CXCR4 con diferentes participantes en la interacción: homo y heterodimerización, reclutamiento de β -arrestina por intermedio de un enfoque de BRTE (bioluminescence resonance energy transfer, transferencia de energía de bioluminiscencia por resonancia) y efecto de Mab m515H7 murino y de Mab c515H7 quiméricos sobre estos dímeros

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos por la ligación de SDF-1 y/o de Mab murino m515H7 y Mab c515H7 quimérico al receptor de CXCR4 al nivel de la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4 así como del reclutamiento de la proteína de señalización β -arrestina-2.

Los vectores de expresión para cada uno de los participantes en la interacción investigados fueron contruidos como proteínas de fusión con el correspondiente tinte (luciferasa de *Renilla reniformes*, proteína fluorescente Rluc y Yellow, YFP) para lo cual se emplearon técnicas convencionales de biología molecular. Dos días antes de llevar a cabo los experimentos de BRET, unas células HEK293 fueron transfectadas de manera transitoria mediante vectores de expresión para los correspondientes participantes en el BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4-Rluc + CXCR2-YFP] para estudiar heterodimerización de CXCR4 y CXCR2 y [CXCR4-Rluc + β -arr2-YFP] para estudiar el reclutamiento, mediado por CXCR4, de β -arrestina-2. Al día siguiente se distribuyeron las células in placas blancas de 96 MW precubiertas con polilisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con FBS al 10 %]. Primero se cultivaron las células a 37°C con CO₂ al 5 % a efectos de permitir la fijación de las células a la placa. Seguidamente

se privaron las células de alimento con 200 μ l DMEM/depresión durante la noche. Inmediatamente antes del experimento de BRET, se retiró el DMEM y las células fueron rápidamente lavadas con PBS. Seguidamente se incubaron las células en PBS de la presencia o ausencia de anticuerpo, 15 min a 37°C antes de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 μ l. Después de incubación durante 5 minutos a 37°C y continuación de la incubación durante 20 min a temperatura ambiente únicamente para los homo y heterodímeros, se dio inicio a la adquisición de la emisión de luz a 485 nm y 530 nm para lo cual se utilizó la lectora Mithras LB940 multilabel reader (Berthold) (1s/longitud de onda/depresión repetido 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se llevó a cabo como anteriormente descrito (Angers et al., 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $\text{Cf} = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc solamente bajo las mismas condiciones experimentales. La simplificación de ecuación muestra que la relación de BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando los dos participantes en el BRET se hallan presentes, corregido por la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solamente el participante fusionado al Rluc se halla presente en el ensayo. Por razones de legibilidad, los resultados se expresaron en unidades de milliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación de BRET multiplicado por 1.000.

El SDF1 (100 nM) incrementó en aproximadamente 10 % la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donante y aceptora fusionadas al receptor de CXCR4 receptor, es probable que indique los cambios en la formación de los homodímeros CXCR4/CXCR4 o los cambios conformacionales de los dímeros preexistentes (Figura 17A). Es interesante observar que el SDF1 (100 nM) disminuyó en aproximadamente 17 % la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donante y aceptor fusionadas a CXCR4 y CXCR2, lo que probablemente indica también la formación de los heterodímeros CXCR2/CXCR4 o los cambios conformacionales de dímeros

preexistentes (Figura 17B). En este último caso, la activación, activada por SDF-1, de CXCR4/CXCR2 parece ser menos favorable para la transferencia de energía por BRET. En ambos casos, los Mabs m515H7 y c515H7 fueron capaces de modular los cambios conformacionales, inducidos por SDF-1, para los homodímeros CXCR4 (inhibición del 96% del incremento, inducido por SDF-1, de BRET para c515H7, Figura 17A) así como para la formación de heterodímero CXCR2/CXCR4 (inhibición del 98 % de la disminución, inducida por SDF-1, para c515H7, Figura 17B). Los Mabs m515H7 y c515H7 también son capaces de modular por sí mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de estos Mabs sobre la conformación tanto de homodímeros CXCR4/CXCR4 como heterodímeros CXCR2/CXCR4 (Figuras 17A y 17B).

La activación de CXCR4 por el SDF-1 (100 nM) resultó en un fuerte reclutamiento de la molécula β -arrestina de señalización intracelular, como se muestra mediante el refuerzo del 400% en la señal de BRET (Figura 17C). Este reclutamiento fue parcialmente inhibido por c515H7 Mab (aproximadamente 93%, Figura 17C) lo que muestra el efecto de estos Mabs sobre la señalización.

Ejemplo 19: movilización, mediado por el receptor de CXCR4, de las reservas de calcio intracelular

Este ensayo funcional fue diseñado para supervisar la señalización del receptor de CXCR4 por intermedio de la estimulación de la trayectoria de fosfolipasa C, que induce la liberación del calcio a partir de las reservas intracelulares desde el retículo endoplasmático.

Se obtuvieron unas células CHO-K1 que de manera estable y constitutiva expresaban el receptor de CXCR4 de tipo salvaje, como se describió en el ejemplo precedente. Unas células U937 (leucemia humana) fueron propagadas en un medio de cultivo completo, respectivamente [DMEM complementado con FCS al 10%] y [RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, solución de aminoácidos no esencial al 1%, piruvato de sodio al 1%, glutamina L al 1%, 4,5 g/l de glucosa]. Todos los tipos de células fueron untadas en placas negras de 96MW

con una densidad de 100.000 células/depresión en un medio de cultivo adecuado. Las células fueron privadas de alimento durante la noche antes de llevarse a cabo los experimentos. Se cargaron las células con el tinte de calcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido Probenicid 25 mM] durante 30 min. a 37°C seguido por 30 min. a 25°C. La estimulación por SDF-1 fue llevada a cabo mediante inyección directa en cada depresión. Para los experimentos de antagonismo, se añadieron 10 µl de solución de Mab directamente en el tampón de carga por lo menos diez minutos antes del SDF-1. Se llevaron a cabo las mediciones cinéticas de fluorescencia sobre una lectora de micro placas por fluorescencia de múltiples modos (multi-mode fluorescence microplate reader) Mithras LB940 (Berthold), para lo cual se utilizaron los siguientes ajustes: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada depresión durante 0,1 segundo cada segundo y durante un intervalo de tiempo de 20 seg antes de la inyección de SDF-1 (señal de base). A continuación se inyectaron 20 µl de SDF-1 y se registraron los datos durante un intervalo de tiempo de dos minutos. Cada condición experimental fue llevada a cabo por duplicado. Los valores para cada depresión fueron primero corregidos para lo cual se restaron la fluorescencia de base y la fluorescencia emitida por una depresión de control sin células. Los datos relativos fueron expresados como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por el SDF-1 (100 nM).

El SDF1 (100 nM) indujo una liberación rápida y fuerte del calcio intercelular en el CHO/CXCR4 recombinante, y en cambio no se detectó ninguna señal de fluorescencia en las células CHO-K1 nativas. La señal máxima llegó a un valor superior a 140 % con respecto a la fluorescencia de base, y se observó a aproximadamente 40 segundos después de la estimulación por SDF-1; se observaron curvas cinéticas similares con células U-937 (Figuras 18A, 18B). El anticuerpo quimérico c515H7 (133 nM) permitió obtener una inhibición fuerte y casi completa de la señal de calcio, inducida por SDF-1 (100 nM), en ambas cepas de células investigadas.

Ejemplo 20: Efecto del Mab m515H7 murino anti-CXCR4 y del Mab c515H7 sobre la migración, inducida por SDF-1, de células

Para evaluar el efecto inhibitor de los Mabs anti-CXCR4 m515H7 y c515H7 sobre el proceso de la migración, unas 100.000 células U-937 en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 2%, fueron untadaas en la cámara superior de cámaras de migración (placas de 24 depresiones con poros de un tamaño de 8 μ m) sea en presencia sea en ausencia de SDF-1 en la parte inferior de las depresiones y con o sin los Mabs c515H7 y m515H7 en la cámara superior. En este ensayo se introdujo IgG2b murino como control de isotipo. Dos horas después de la aplicación se contaron las células migrantes. Los resultados representados en la Figura 19 demuestran que, como era de esperar, el SDF-1 se caracterizó por inducir un incremento significativo en la migración de las células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células fueron sometidas a incubación con el control de isotipo IgG2. En cambio, para las células incubadas con las Mabs c515H7 y m515H7, se observó una disminución significativa y reconocible en la migración, inducida por el SDF-1, de las células: aproximadamente más del 80% con los Mabs c515H7 y m515H7.

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

Se cultivaron células U937 de ATCC en medio RPMI 1640, FCS al 10%, glutamina L al 0,1%. Se dividieron las células dos días antes del injerto, de manera que se hallan en la fase exponencial de su desarrollo. Se inyectaron 10 millones de células U937 i.p. a ratones NOD/SCID hembra,. Después de la implantación, los ratones fueron tratados con una dosis de carga de 2 mg de Mab c515H7/ratón, y seguidamente dos veces por semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Los ratones de control recibieron inyecciones de PBS, ya que en estudios anteriores se había comprobado que no se observaba ninguna diferencia en cuanto a la supervivencia entre ratones que recibieron inyecciones de PBS y ratones a los que se había administrado control de isotipo IgG de ratón. La supervivencia de los ratones fue supervisada diariamente.

Los resultados descritos en la Figura 20 muestran que los ratones tratados con el Mab c515H7 tuvieron un incremento drástico y significativo en sus vidas con T/C% de aproximadamente 180.

Ejemplo 22: Humanización de anticuerpo murino anti-CXCR4 515H7

Procedimiento General

Se llevó a cabo la humanización de anticuerpo 515H7 anti-CXCR4 mediante la aplicación de las reglas globales de injertado por CDR. Se llevaron a cabo el análisis inmunogénico y la definición de CDR y de las regiones de bastidor (FR, framework) mediante la aplicación del esquema único de numeración IMGT así como de las bibliotecas y herramientas de IMGT (Lefranc, 1997 – www.imgt.org).

Se evaluó la eficiencia del proceso de la humanización mediante el ensayo de la actividad funcional de los anticuerpos diseñados en base a su capacidad de inhibir el reclutamiento, mediado por SDF-1, de la β -arrestina mediante un ensayo BRET (Transferencia de la energía de bioluminiscencia). En este ensayo, se rotuló el CXCR4 con luciferasa y β -arrestina con YFP. El reclutamiento, mediado por SDF-1, de β -arrestina al CXCR4, es un paso importante en la transducción de señales de CXCR4. La ligación de variantes humanizadas de 515H7 también fue determinada sobre una cepa NIH3T3 de células establemente transfectada con CXCR4 humano. La actividad de ligación fue evaluada mediante un ensayo de competición con el anticuerpo de ratón biotinilado. En una segunda tentativa, se evaluaron los anticuerpos humanizados para establecer su capacidad de inhibir la ligación del SDF-1 a las células RAMOS. Se eligieron las células RAMOS debido a su elevada expresión de CXCR4 y su baja expresión de CXCR7 y SDF-1.

Se utilizaron estos ensayos para caracterizar las versiones humanas recombinantes de anticuerpos anti-CXCR4. Se formatearon dominios variables con dominios constantes de IgG1/k humanos, y se los clonó en el vector de expresión de mamífero pCEP. Los anticuerpos recombinante derivados de IgG₁/k fueron expresados transitoriamente en células HEK293 células. Los materiales sobrenadantes del cultivo de expresión fueron purificados mediante sefarosa de

proteína A. Los anticuerpos purificados fueron retamponados en PBS, y se determinaron las concentraciones de los anticuerpos mediante ELISA.

Humanización de dominios variables de 515H7

A efectos de seleccionar una cepa germinal humana adecuada para el injerto por CDR, se identificó el gen de la cepa germinal humano con la homología más elevada con respecto a secuencia murina 515H7 VH. Con la ayuda de bases de datos y herramientas de IMGT, se seleccionó el gen de la cepa germinalIGHV3–49*04 humana y el gen de la cepa germinal deIGHJ4*01 J humana como secuencias aceptoras humanas para las CDR murinos 515H7. El gen V humanoIGHV3–49*04 tiene una homología de 80,27% con respecto al gen V del dominio variable del de la cadena pesada 5157H de ratón. La homología para el gen J humanoIGHJ4*01 J es del 87,50%. Hay diez y nueve radicales diferentes entre los genes de cepa germinal humana elegida y el dominio VH del anticuerpo de ratón 515H7. La alineación entre el dominio VH del anticuerpo progenitor y las secuencias de cepa germinal se ilustra en la Figura 21.

En cuanto al dominio variable de la cadena liviana, se seleccionaron los genes de cepa germinal humanaIGKV4–1*01 yIGKJ1*01 (Figura 22). La homología con el gen V humano es del 79,12 %. El gen J 515H7 de la cadena liviana tiene una homología de 84,85% con respecto al gen JIGKJ1*01.

La secuencia de aminoácidos de los genes trasladados de cepa germinal humanaIGHV3–49*04 yIGKV4–1*01 fue utilizada para identificar anticuerpos homólogos que habían sido cristalizados. Para la cadena pesada se eligió como modelo el anticuerpo con el número de registro 1MAM en el Banco de Datos de Proteínas RCSB, mientras que para la cadena liviana se eligió el anticuerpo 1SBS. Se ensamblaron los dos dominios mediante la visual DS de programa de computadora y se utilizó como un modelo para el anticuerpo humanizado 515H7.

Sobre la base de cada radical que es diferente entre el anticuerpo progenitor y la secuencia de cepa terminal humana correspondiente, se dio un orden de rango de prioridad para cada radical que difiera entre las secuencias humana y de ratón (Figuras 21 y 22). Se utilizaron estas prioridades para crear

tres variantes diferentes de cada dominio humanizado variable con los nombres VH1, VH2 y VH3, respectivamente.

En una primera serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades ligantes anti-CXCR4 de las primeras tres variantes humanizadas. Se combinó la variante 1 de VH (VH1) con el VL murino, y se evaluaron estos constructos para establecer su capacidad de inhibir la ligación de un anticuerpo progenitor 515H7 murino biotinilado. Todos los constructos mostraron una capacidad similar para competir con el anticuerpo murino (Figura 23A–C). Esto indica que la variante VH más humana tiene la misma capacidad de ligación de las variantes menos humanas. Por ello se combinó el VH1 con las tres variantes diferentes de VL (Figura 23D–F). Únicamente la combinación de VH1 y VL3 mostró una capacidad reducida para competir con el anticuerpo murino biotinilado, mientras que la variante más humana VH1 VL1 que no lleva mutaciones inversas en sus armazones mostró la misma actividad de bloqueo cruzado que el anticuerpo quimérico.

Esta variante VH1 VL1 fue sometida un ensayo ulterior para establecer su capacidad de inhibir el reclutamiento, mediado por SDF-1, de β -arrestina en los ensayos BRET (Figura 24). A pesar de una actividad de ligación con respecto al receptor, determinada mediante bloqueo cruzado del anticuerpo progenitor, el constructo VH1 VL1 mostró solamente una disminución del reclutamiento de β -arrestina. Esta ausencia de una fuerte actividad inhibidora hace que sea necesaria la sustitución de los radicales de armazón humano por radicales murinos. Se construyeron mutaciones inversas simples para el VH 1. Fueron sustituidos los siguientes radicales: V48L, E61D, D76N y A81L (numeración de acuerdo con la secuencia primaria de los aminoácidos). Estas mutantes inversas simples de la variante VH1 fueron combinadas con la variante VL1. De los mismos, solamente la mutación inversa D76N condujo a una inhibición acrecentada de la transducción de las señales evaluada por el ensayo BRET (Figura 25B).

Para incrementar la actividad de este constructo y para evaluar la importancia de otros radicales se construyeron diferentes mutantes inversos de

radicales para el VH 1. La actividad inhibidora de estos constructos se mejoró ligeramente (inhibición promedia de aproximadamente 45–50 %), pero no fue satisfactoria (Figura 25C). El mutante inverso simple D76N era una continuación de combinada con las tres variantes VL diferentes (Figura 25D). El constructo hz515H7 VH D76N VL2 mostró una actividad de 88,2 % en promedio, lo que se halla en el mismo intervalo que el anticuerpo quimérico.

Se construyeron mutaciones inversas simples y dobles del dominio VL1 de la variante, y se comparó su actividad con la actividad del constructo hz515H7 VH1 D76N VL2 (Figura 26). Ninguna de estas combinaciones ensayadas tuvo una actividad similar a la de su constructo, ni superior a la de éste.

Se calculó el porcentaje de radicales humanos en el armazón para hz515H7 VH1 D76N VL2: contiene 14 radicales no humanos de entre 180 radicales, lo cual equivale a un “índice de germinalidad” de 92,2 %. A título de comparación, los anticuerpos humanizados y comercializados bevacizumab y trastuzumab contienen respectivamente 30 y 14 radicales no humanos en sus dominios variables.

También se ensayaron las cuatro formas mejor humanizadas, que mostraban la eficacia más fuerte para inhibir el reclutamiento, mediado por SDF–1, de la β -arrestina, para establecer su capacidad de inhibir la ligación de SDF–1 biotinilado (Figura 27A). Se determinó una correlación estrecha de la inhibición de la ligación de SDF–1 y del reclutamiento de β -arrestina. Esta correlación indica que es sumamente probable que la inhibición de la ligación de SDF–1 sea el mecanismo principal de la inhibición de la transducción de las señales.

A efectos de humanizar más aún la variante hz515H7 VH1 D76N VL2, se diseñaron tres variantes adicionales, para lo cual se utilizó la información obtenida con los mutantes dobles y triples evaluados en la Figura 26. Fueron humanizados cuatro y cinco radicales adicionales en las respectivas variantes VL2.1, VL2.2 y VL2.3 (que también llevan la denominación de VL2–1, VL2–2 y VL2–3). Corresponden a los residuos D9, P49, D66, S69, S83, L84; V89. En la Figura 28 se muestra una alineación de estas tres variantes en comparación con VL2.

Se evaluó la capacidad de estas variantes VL2 para inhibir el reclutamiento, mediado por SDF-1, de la β -arrestina. Las variantes humanizadas hz515H7 VH1 D76N VL2, VL2.1, VL2.2 y VL2.3 mostraron una actividad similar a la del anticuerpo quimérico c515H7 (Figura 26).

Humanización de dominios variables de 515H7-2

A efectos de generar otra forma humanizada, se seleccionó otra cepa germinal adecuada para el injerto de CDR, tanto para el dominio variable de la cadena liviana como de la cadena pesada. Para ambas se seleccionó la cepa germinales no solamente en cuanto al porcentaje de homología con la secuencia murina, sino también por cuanto tienen la misma longitud de CDR que el VL y VH, respectivamente del, 515H7 murino.

Con la ayuda de bases de datos y herramientas de IMGT, se seleccionaron el gen de cepa germinal IGHV3-73*01 humano y el gen de cepa germinal IGHJ4*01 J humano como secuencias aceptoras humanas para los 515H7 VH CDR murinos. El gen V humano IGHV3-73*01 tiene una homología superior al 79 % para el gen V del dominio variable de la cadena pesada 515H7 de ratón. La homología para el gen humano J IGHJ4*01 J es de 87,50%.

En cuanto al dominio variable de la cadena liviana, se seleccionaron los genes de cepa germinal humana IGKV2D-40*01 y IGKJ1*01. La homología con gen V humano IGKV2D-40*01 es mayor del 70 %. El gen J de 515H7 de la cadena liviana tiene una homología de 84,85% con respecto al gen J humano IGKJ1*01.

Sobre la base de la posición de cada radical que es diferente entre el anticuerpo progenitor y la correspondiente secuencia de cepa germinal humana, y en base al conocimiento de la persona con pericia en especialidad, se identificaron varios radicales críticos como radicales inversamente mutados.

En cuanto a la cadena pesada, estos radicales son H35S, V48L, R50F, A61D, D76N y/o A81L (véase SEQ ID Nos. 86 y 90 de la Tabla 2c).

Con respecto a la cadena liviana, estos radicales son L9S, I21M, D40A, L43Q, Y59A, A61D, D66A, S69T, G74E, D76Y y/o V89L (véase SEQ ID Nos. 85 y 89 de la Tabla 2c).

Ejemplo 23: Caracterización por análisis FACS del carácter de ligación específica de Mabs 515H7 humanizado anti-CXCR4 y reconocimiento de cepas de células de cáncer

En este experimento, mediante análisis FACS se examinó la ligación específica a CXCR4 humano, de Mabs 515H7 humanizado anti-CXCR4.

Unas células NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4 aceptadas y cepas de células U937 Ramos, fueron sometidas a incubación con de 0 a 10 µg/mL de Mabs 5115H7 humanizado (hz515H7 VH1 D76N VL2 [=hz515H7VL2], hz515H7 VH1 D76N VL2.1 [=hz515H7VL2.1], hz515H7 VH1 D76N VL2.2 [=hz515H7VL2.2] y hz515H7 VH1 D76N VL2.3 [=hz515H7VL2.3]) durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad en 100 µl de tampón Facs. Después de lavar tres veces en tampón Facs, las células fueron sometidas a incubación con el anticuerpo secundario, un Alexa 488 anti-humano de cabra (dilución 1/500), durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de lavar tres veces en tampón Facs buffer, se añadió ioduro de propidio en cada depresión y solamente las células viables fueron analizadas por Facs. Se estudiaron por lo menos 5.000 células viables para evaluar el valor medio de la intensidad de fluorescencia para cada condición.

Los resultados de estos estudios de ligación se proveen en las Figuras 29A–29C que muestran MFI [Mean Fluorescence Intensity, Intensidad Media de la Fluorescencia obtenida por FACS] con el que el Mabs hz515H7 humanizado anti-CXCR4 se liga específicamente a la cepa de células transfectadas humanas CXCR4–NIH3T3 (Figura 29A) (MFI= 2.2 con células progenitoras NIH3T3) y también reconocen cepas humanas de células de cáncer, por ejemplo U937 (Figura 29B) y Ramos (Figura 29C).

Ejemplo 24: Modulación de la ligación de [³⁵S]GTPγS a membranas celulares que expresan el receptor de CXCR4 de tipo salvaje por Mabs 515H7 humanizado anti-CXCR4

Este ensayo funcional permite supervisar la activación de la proteína G por intermedio del receptor de CXCR4 humano de tipo salvaje y su modulación por Mabs 515H7 humanizado anti-CXCR4.

Se obtuvieron unas células de NIH-3T3 que de manera estable y constitutiva expresan el receptor de CXCR4 de tipo salvaje, como se describió en el ejemplo precedente para las células CHO-K1. Se llevó a cabo la ligación [^{35} S]GTP γ S sobre membranas celulares obtenidas mediante rascado mecánico en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM] seguido por centrifugación (10.000 g, 15 min). Se llevó a cabo la incorporación y detección de [^{35} S]GTP γ S (actividad específica: 1.000 Ci/mmol) para lo cual se utilizó la tecnología SPA (ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (10 μ g/depresión) fueron sometidas a incubación en tampón de ligación [Hepes 20mM, GDP 3 μ M, MgCl $_2$ 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH = 7.4] junto con compuesto para evaluar (SDF-1 y Mabs de interés), [^{35} S]GTP γ S (0,2–0,4 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se llevó a cabo la reacción de ligación durante una hora a 25°C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se llevaron a cabo conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se calcularon los IC $_{50}$ para cada Mab.

Bajo estas condiciones experimentales, los IC $_{50}$ de los Mabs 5157 humanizados (hz), determinados en células NIH3T3/CXCR4, eran de 3,86 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 (Figura 30A), 4,05 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-1 (Figura 30B), 5,19 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-2 (Figura 30C) y 8,5 nM para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-3 (Figura 30D).

Los Mabs también fueron capaces de inhibir la ligación de [^{35} S]GTP γ S estimulado por SDF-1 (100 nM) con un porcentaje de inhibición del 86% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2, 69% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-1, 66% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-2. y 58% para Mab hz515H7 VH1 D76N VL2-3 (Figura 31).

Ejemplo 25: Asociación de CXCR4 con diferentes participantes en la interacción: homo y heterodimerización, reclutamiento de β -arrestina por intermedio de un enfoque de BRET (bioluminescence resonance energy transfer), y efecto de los a Mabs 515H7 humanizados sobre estos dímeros.

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos por la ligación de los Mabs humanizados SDF-1 y/o 515H7 sobre el receptor de CXCR4 para la formación del homodímero CXCR4 y del heterodímero CXCR2/CXCR4 así como para el reclutamiento de la proteína de señalización β -arrestina-2.

Se construyeron vectores de expresión para cada uno de los miembros intervinientes en la interacción como proteínas de fusión con el tinte correspondiente (luciferasa de *Renilla reniformis*, proteína fluorescente Rluc y Yellow, YFP) para lo cual se aplicaron técnicas convencionales de biología molecular. Dos días antes de llevar a cabo los experimentos BRET, unas células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con vectores de expresión que codificaban los correspondientes miembros que intervienen en el BRET: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4, [CXCR4-Rluc + CXCR2-YFP] para estudiar la heterodimerización de CXCR4 y CXCR2, y [CXCR4-Rluc + β -arr2-YFP] para estudiar el reclutamiento, mediado por CXCR4, de β -arrestina-2. El día después, se distribuyeron las células en placas blancas de 96 MW precubiertas con polilisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con FBS al 10%]. Las células fueron primero cultivadas a 37°C con CO₂ al 5 % a efectos de permitir la fijación de las células a la placa. Las células fueron seguidamente privadas de alimento con 200 μ l de DMEM/depresión durante la noche. Inmediatamente antes del tratamiento de BRET, se retiró el DMEM y se lavaron las células rápidamente con PBS. Seguidamente se incubaron las células en PBS en la presencia o ausencia de anticuerpo, durante 15 min a 37°C antes de de la adición de coelenterazina H 5 μ M con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 μ l. Después de incubación durante 5 minutos a 37°C y otra incubación durante 20 min a temperatura ambiente solamente para homo- y

heterodímeros, se inició la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm, para lo cual se utilizó la lectora Mithras LB940 de múltiples etiquetas (Berthold) (1s/longitud de onda/depresión repetida 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de las relaciones de BRET se llevó a cabo como descrito anteriormente (Angers et al., 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, donde $\text{Cf} = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc bajo las mismas condiciones experimentales. Dado que esta ecuación muestra que la relación de BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando los dos miembros de BRET se hallan presentes, corregida por la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solamente el miembro fusionado a Rluc se halla presente en el ensayo. Por razones de legibilidad, los resultados se expresan en unidades de milliBRET (mBU); mBU corresponde la relación de BRET multiplicada por 1.000.

El SDF1 (100 nM) incrementó en aproximadamente 12 % la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donante y aceptora fusionadas al receptor de CXCR4, es probable que indique la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o los cambios conformacionales de dímeros preexistentes (Figura 32A). Es interesante observar que el SDF1 (100 nM) disminuyó en aproximadamente 16 % la señal de BRET resultante de la proximidad espacial de las proteínas donante y aceptora fusionadas a CXCR4 y CXCR2, siendo probable que esto también indique la formación de heterodímeros CXCR2/CXCR4 o cambios conformacionales de dímeros preexistentes (Figura 32B). En este último caso, la conformación, activada por SDF-1, de CXCR4/CXCR2 parece menos favorable para transferencia de energía por BRET. En ambos casos, los Mabs 515H7 humanizados fueron capaces de modular los cambios conformacionales, inducidos por SDF-1, para los homodímeros CXCR4 con un porcentaje de inhibición de incremento, inducido por SDF-1, de BRET de aproximadamente 88% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2, 65% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, 33 % para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.2 Mab y 21%

para Mab hz515H7 VH1D76N–VL2.3 (Figura 32A) así como también para CXCR2/CXCR4 con un porcentaje de inhibición de la disminución, inducida por SDF–1, de BRET de aproximadamente 100% para Mab hz515H7 VH1D76N–VL2 y de 50% para los Mabs hz515H7 VH1D76N–VL2.1, hz515H7 VH1D76N–VL2.2 y hz515H7 VH1D76N–VL2.3 (Figura 32B). Los Mabs 515H7 humanizados también fueron capaces de modular por si mismos la proximidad espacial de CXCR4/CXCR4 y CXCR2/CXCR4 respectivamente, lo que indica una influencia de estos Mabs sobre la conformación tanto de homodímero CXR4/CXCR4 como de heterodímero CXCR2/CXCR4 (Figuras 32A y 32B).

La activación del CXCR4 por SDF–1 (100 nM) resultó en un fuerte incremento de la molécula beta–arrestina de señalización intracelular, como se muestra por el refuerzo del 390 % en la señal de BRET (Figura 32C). Este reclutamiento estuvo parcialmente inhibido por Mabs humanizados 515H7 con una inhibición de aproximadamente 94 % para Mab hz515H7 VH1D76N–VL2, 81% para Mab hz515H7 VH1D76N–VL2.1, 82% para Mab hz515H7 VH1D76N–VL2.2, y 71% para hz515H7 VH1D76N–VL2.3 (Figura 32C) lo que muestra el efecto de estos Mabs sobre la señalización.

Ejemplo 26: Estudios Inmunohistoquímicos (IHC)

Se desparafinaron secciones, se las rehidrató y colocó durante 7 minutos en EDTA pH8 pretibio a 98°C para recuperación de epitopo inducida por calor. Después de tres lavados en Tampón Tris Buffer Salina–0.05% tween 20 (TBS–T) (Dako S3006) se bloqueó la actividad de peroxidasa endogena mediante Reactivo de Bloqueo de Peroxidasa (Peroxidase Blocking Reagent, Dako K4007) durante cinco minutos. Se lavaron las secciones con TBS–T y se las incubó en reactivo de bloqueo (UltraV block–TA–125UB– LabVision) durante 5 minutos antes de incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti–CXCR–4 (50 µg/ml, clon 515H7, Pierre Fabre) o ratón IgG1/kappa (50 µg/ml, X0931, Dako) como un control durante la noche a 4°C. Se lavaron las secciones con TBS–T y se las incubó con Envision Dual Link durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó diaminobenzidina para el desarrollo de un producto de reacción marrón (Dako

K3468). Se sumergieron los slides en hematoxilina durante 4 minutos para contrateñido (Dako S3309) y se los lavó en PBS antes de su montaje en medio de montaje Faramount más coverslipe. En este procedimiento de inmuno histoquímica, el producto de reacción marrón está relacionado con teñido positivo de la membrana celular, y la ausencia de producto de reacción marrón se corresponde un teñido negativo y ausencia de visualización de la membrana de las células.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR4, clon 515H7, tiñó de manera diferencial la membrana de las células de varios tipos de tumores. En las Figuras 33 y 34 se ilustra el teñido llevado a cabo en dos modelos de xenoinjerto en los que se ha descrito una actividad anti-tumoral para 515H7: RAMOS y KARPAS299. Como se muestra en las Figuras 33 y 34, el teñido obtenido depende del fijador. De hecho, el teñido de las membranas fue más débil cuando los tejidos se fijaron con formalina (Figuras 34a y 34c), mientras que, cuando se utilizó Glyo-fixx (un sustituto de la formalina), el teñido membranoso se incrementó de manera significativa (Figuras 33a y 33c).

Ejemplo 27: Ligazón de competición de Mabs 515H7 humanizado anti-CXCR4 para [¹²⁵I]SDF-1 en membranas de CHO-K1 que expresan establemente el receptor de CXCR4 humano

Este ensayo permite evaluar la capacidad de los Mabs 515H7 humanizados de competir para la ligación de receptor de CXCR4 humanizado radioetiquetado, en sitios de ligación ortostéricos o alostéricos.

Se obtuvieron células CHO-K1 que de manera estable y constitutiva expresan el receptor de CXCR4 humano, mediante transfección de células CHO-K1 nativas (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero que lleva la secuencia de codificación completa del receptor de CXCR4 humano (RefSeq NM_003467). Unas células fueron propagadas en medio de cultivo completo [DMEM-Ham's F12 complementado con suero fetal de ternero al 5% (FCS) y 500 µg/ml de geneticina]. Se llevaron a cabo experimentos de ligación de radioligando sobre membranas de células obtenidas mediante rascado mecánico de células

CHO/CXCR4 en tampón de lisis [Hepes 20mM, pH 7,4, NaCl 150mM] seguido por centrifugación (10.000g, 15 min). Se llevó a cabo la actividad de ligación de [^{125} I]SDF-1 (actividad específica: 1.500 Ci/mmol) para lo cual se utilizó la tecnología SPA (ensayo de proximidad por centelleo – GE Healthcare). En pocas palabras, unas membranas de células (30 μ g/depresión) fueron sometidas a incubación en tampón de ligación [Hepes 20mM, pH 7,4, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1%] junto con compuesto para evaluar (SDF-1 o mAb), radioligando (1 nM) y finalmente pellas de SPA-WGA-PVT (7,3 mg/depresión). Se alcanzó el equilibrio de ligación después de 1 h a 25 °C. Durante la centrifugación [1.000 g durante 10 min.] se midieron los conteos radioactivos en un contador de centelleo (TopCount, Perkin Elmer). Se estimó la ligación NS (non-specific, no específica) en la presencia de 10 μ M de SDF-1 no etiquetado.

Los Mabs anti-CXCR4 compitieron eficientemente por la ligación de [^{125} I]SDF-1 con el siguiente orden de rango de eficiencia en la competición (% de inhibición de [^{125} I]SDF-1): hz515H7 VH1D76N VL2 (77%), hz515H7 VH1D76N VL2.1 (68%), hz515H7 VH1D76N VL2.2 (61%) y hz515H7 VH1D76N VL2.3 (49 %) (Figura 35A).

Los Mabs 515H7 que dependen de la dosis inhibieron la ligación de [^{125} I]SDF-1 con un IC_{50} de 1,44 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2 (Figura 35B), 6,69 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2.1 (Figura 35C), 5,91 nM para Mab hz515H7 VH1D76N VL2.2 (Figura 35D)

Ejemplo 28: movilización, mediada por el receptor de CXCR4, de reservas de calcio intracelular

Este ensayo funcional fue diseñado para supervisar la señalización del receptor de CXCR4 por intermedio de la estimulación de la trayectoria de fosfolipasa C, que induce la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico.

Unas células U937 (leucemia humana) fueron propagadas en medio de cultivo completo [RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, HEPES 20 mM, solución de aminoácido no esencial al 1%, piruvato de sodio al 1%, glutamina L al 1%, 4,5 g/l de glucosa]. Se aplicaron las células sobre placas negras de 96MW

con una densidad de 100.000 células/depresión en un medio de cultivo adecuado y se las privó del alimento durante la noche antes de llevarse a cabo los experimentos. Se cargaron las células con el tinte de calcio fluorescente (Fluo-4 No Wash, Invitrogen US) en tampón de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido Pronbenicid 25 mM] durante 30 min. a 37 °C seguido por 30 min. a 25°C. Se llevó a cabo la estimulación mediante SDF-1 por inyección directa en cada depresión. Para los experimentos de antagonismo, se añadieron 10 µl de solución de Mab directamente en el tampón de carga por lo menos 10 minutos antes del SDF-1. Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia cinéticas sobre una lectora de microplacas de fluorescencia multi-mode (multi-mode fluorescence microplate reader Mithras LB940 (Berthold), para lo cual se utilizaron los siguientes ajustes: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10.000 unidades arbitrarias. Se registró la fluorescencia en cada depresión durante 0,1 segundo y durante un intervalo de tiempo de 20 segundos antes de la inyección de SDF-1 (señal de base). Se inyectaron seguidamente 20 µl de SDF-1 y se continuó con el registro de datos durante un periodo de tiempo de dos minutos. Cada condición experimental se llevó a cabo por duplicado. Los valores para cada depresión se corrigen en primer término restando la fluorescencia de base y la fluorescencia una depresión de control sin células. Los datos relativos se expresan como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

El SDF1 (100 nM) indujo una liberación rápida y fuerte del calcio intracelular en las células U937. La intensidad máxima llegó al > 340 % con respecto a la fluorescencia de base, y se observó a aproximadamente 40 segundos después de la estimulación por Mab SDF-1. El Mab hz515H7 VH1D76N VL2 (133 nM) resultó en la inhibición parcial de la señal de calcio, inducida por SDF-1 (100 nM), en cepas de células U937 (Figura 36 en la que Mab lleva simplemente la designación de hz515H7VL2 en el subtitulo).

Ejemplo 29: Efecto de Mab hz515H7 humanizado anti-CXCR4 sobre la migración de células U 397 inducida por SDF-1

Para evaluar el efecto inhibidor del Mab hz515H7 VH1D76N VL2 humanizado anti-CXCR4 (que lleva la referencia hz515H7) sobre el proceso de la migración, unas células U937 fueron sometidas a incubación con 10 µg/ml de anticuerpos durante 40 minutos en medio RPMI1640 que contiene FBS al 2% a 37°C en CO₂ al 5%. Un total de 5×10^4 células colocadas en la cámara de transdepresión superior (Corning Lowell, MA, EE.UU.). En la cámara inferior se añadió SDF-1 (100 ng/ml) en un medio que contenía FBS al 2%. La migración de células U937 fue medida mediante el conteo de la cantidad de células que migró desde las cámaras de transdepresión a las dos horas después de sembrar las células en la cámara superior. Se contaron las células migradas mediante el ensayo CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay que mide la cantidad de células viables en cultivo, sobre la base de la cuantificación del ATP.

Los resultados presentados en la Figura 37A demostraron que, como era de esperar el SDF-1 fue capaz de inducir un incremento significativo de la migración de células U-937. No se observó ningún efecto cuando las células fueron sometidas a incubación con el control de isotipo IgG1. En cambio, en la Figura 37A se muestra la inhibición de la migración, inducida por SDF1, de las células U937 mediante 10 µg/ml de Mab hz515H7 VH1 D76N VL2. Los resultados representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

La Figura 37B representa el efecto de un intervalo de dosis de Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 sobre la migración, inducida por SDF-1, de células. Los resultados representan la media $\pm$ S.E.M de cuatro experimentos independientes ($IC_{50} = 4,53 \cdot 10^{-3}$ µg/ml $\pm$ $2,2 \cdot 10^{-3}$).

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

Se desparafinaron secciones, se las rehidrató, y colocó durante 7 minutos en EDTA pH 8 pretibio a 98°C para la recuperación de epitopo inducida por calor. Después de 3 lavados en Tris Tampón Saline-0.05% tween 20 (TBS-T) (Dako S3006), se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena mediante Reactivo de

Bloqueo de Peroxidasa (Peroxidase Blocking Reagent, Dako K4007) durante cinco minutos. Se lavaron las secciones con TBS-T y se las incubó en reactivo de bloqueo (UltraV block-TA-125UB- LabVision) durante 5 minutos antes de incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR-4 (50 µg/ml, hz515H7 VH1 D76N VL2, Pierre Fabre) o el IgG1 humano biotinilado (50 µg/ml, BP078, The Binding Site) como un control durante la noche a 4°C. Se lavaron las secciones con TBS-T y se las incubó con estreptavidina HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó diaminobenzidina para el desarrollo de un producto de reacción marrón (Dako K3468). Se sumergieron los slides en hematoxilina durante 4 minutos para contrateñido (Dako S3309) y se los lavó en PBS antes de su montaje en medio de montaje Faramount más coverslipe. En este procedimiento de inmuno histoquímica, el producto de reacción marrón está relacionado con el teñido positivo de la membrana celular, y la ausencia de producto de reacción marrón se corresponde a un teñido negativo y ausencia de visualización de la membrana de las células.

El anticuerpo humanizado anti-CXCR4, 515H7 VH1 D76N VL2, tiñe de manera diferencial la membrana de las células de varios tipos de tumores. En las Figuras 38 y 39 se ilustran los teñidos llevado a cabo en dos modelos de xenoinjerto en los que se ha descrito una actividad anti-tumoral cuando los ratones fueron tratados con 515H7: RAMOS y KARPAS299. Como se muestra en las Figuras 38 y 39, el teñido obtenido depende del fijador. De hecho, el teñido membranoso es más débil cuando los tejidos se fijaron con formalina (Figuras 94a y 39c), mientras que, cuando se utilizó Glyo-fixx (un sustituto de la formalina), el teñido membranoso se incrementó de manera significativa (Figuras 38^a y 38c).

Ejemplo 31: efecto de 515H7 quimérico (c515H7), humanizado forma Mabs hz515H7 VH1D76N VL2 y hz515H7 VH1 D76N VL2.1 Mabs sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto de células B en ratones Scid

Unas células Ramos de ATCC fueron cultivadas de manera rutinaria en medio RPMI 1640, FCS al 10% y L-Glu 2 mM , St Louis MD, USA). Se dividieron las células durante 48 horas antes de su injerto de manera que están en la fase

exponencial de su crecimiento. Se injertaron diez millones de células Ramos en PBS s.c. a ratones SCID hembras de 7 semanas de edad (Charles River, France). Cinco días después del implante, los tumores eran medibles (media 10 mm³) y los animales fueron divididos en grupos de 6 ratones con tumores de tamaño comparable. Los ratones fueron tratados i.p. con una dosis de carga de Mabs c515H7, hz515H7 VH1D76N VL2 o hz515H7 VH1 D76N VL2.1. A continuación, a los ratones se les inyectó dos veces por semana con 1 mg/dosis/ratón de Mabs c515H7, hz515H7 VH1 D76N VL2 o hz515H7VH1 D76N VL2.1. En este experimento se introdujo un grupo PBS como un grupo de control. Se midió el volumen del tumor dos veces por semana y se lo calculó mediante la siguiente fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos en cada medición mediante una prueba de Mann–Whitney.

En estos experimentos, no se observó ninguna mortalidad durante el tratamiento. En comparación con el grupo PBS, no hubo una inhibición significativa del crecimiento del tumor entre los días D11 y D54 para Mab c515H7 (Figura 40), Mab hz515H7 VH1 D76N VL2 (Figura 41) y hz515H7 VH1 D76N VL2.1 (Figura 42) 1 mg/dosis, y se redujo el volumen promedio de los tumores después de 4 semanas de tratamiento en 92% para los ratones tratados con Mabs c515H7 y hz515H7 Mabs en comparación con el grupo PBS.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> NUEVOS ANTICUERPOS ANTI CXCR4 HUMANIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

<130> D28523

<150> EP 10290167.5

<151> 2010-03-30

<160> 96

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

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

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
 35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
 50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val

145 150 155 160

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

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

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

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

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

Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

Phe His Ser Ser
 355

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

<210> 4
<211> 8
<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
1 5

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

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

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

<400> 6

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

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

<400> 7

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

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

<400> 8

Trp Ala Ser
1

<210> 9

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

<400> 9

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
1 5

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 14

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

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

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

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

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

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

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 24
<211> 450
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 25
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165170175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180185190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195200205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210215

<210> 26

<211> 219

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

151051

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

202530

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

354045

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

505560

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65707580

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

859095

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

100105110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 27
<211> 219
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 27

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

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

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

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

505560

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65707580

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
859095

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100105110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115120125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130135140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145150155160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165170175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180185190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195200205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210215

<210> 28
<211> 219
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 29
<211> 219
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 30
<211> 219
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

100105110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115120125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130135140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145150155160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165170175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180185190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195200205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210215

<210> 31

<211> 219

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

151015

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

202530

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

354045

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

- <210> 32
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> CDR humanizada optimizada

<400> 32
ggcttcacct tcaccgacaa ctac 24

<210> 33
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR humanizada optimizada

<400> 33
atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 30

<210> 34
<211> 33
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR humanizada optimizada

<400> 34
gccagggacg tgggcagcaa ctactcgac tac 33

<210> 35
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR humanizada optimizada

<400> 35
cagagcctgt tcaacagccg gacccggaag aactac 36

<210> 36
<211> 9
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR humanizada optimizada

<400> 36
tgggccagc 9

<210> 37

<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR humanizada optimizada

<400> 37
atgcagagct tcaacctgcg gacc 24

<210> 38
<211> 360
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 38
gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 39
<211> 360
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VH

<400> 39
gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 40
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VH

<400> 40
 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gactacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 41
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VH

<400> 41
 gaggtgaacc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgcctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gactacgccg ccagcgtgag aggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 42
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 42

gacatcgtga tgaccagag cccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60

atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcacaaga 180

gaaagcggcg tgcccagaccg ctttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240

atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 43

<211> 336

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 43

gacatcgtga tgaccagag cccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60

atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180

gacagcggcg tgcccagaccg ctttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240

atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 44

<211> 336

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 44

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60

atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccgg ccagtcccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180

gatagcggcg tgcccgtcg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240

atcagccggg tgcaggccga ggacctgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 45
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 45
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcggggccacc 60
 atgtcctgca agtctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgccgacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 46
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 46
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcggggccacc 60
 atgtcctgca agtctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 47
 <211> 336
 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 47

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcggggccacc 60

atgtcctgca agtctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180

gactctggcg tgcccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240

atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 48

<211> 336

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VL

<400> 48

gacatcgtga tgaccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcggggccacc 60

atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180

gatagcggcg tgcccgaccg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240

atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 49

<211> 1350

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VH

<400> 49

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctgggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcttgaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcaciaa agggcccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660

 aagagctgtg acaagacca cacctgccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gttctaccc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccaggaag 1350

<210> 50
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VH

<400> 50

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacia agggcccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagacca cacctgcccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
 ccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtgtt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cgccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggaca gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc ttagcctgtc ccaggcaag 1350

<210> 51

<211> 1350

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VH

<400> 51

```

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg   60
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc   120
cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca   180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt   240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg   300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc   360
gccagcacia agggccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc   420
ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc   480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc   540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc   600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc   660
aagagctgtg acaagacca cacctgcccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga   720
cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc   780
gaggtgacct gtgtggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg   840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac   900
agcacctaca ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactgggt gaacggcaag   960
gagtacaagt gtaagggtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc  1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag caggaggag  1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc  1140
gccgtggagt gggagagcaa cgccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg  1200
ctggacagcg acggcagctt ctctgttac agcaagctga ccgtggaca gagcagatgg  1260
cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc  1320
cagaagagcc tgagcctgtc ccaggcaag                                     1350

```

<210> 52

<211> 1350

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> variante humanizada de VH

<400> 52

gaggtgaacc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggctt cacctcacc gacaactaca tgcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gactacgccg ccagcgtgag aggccgggtc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccaggga cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagcacaaggggccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tgaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
aagagctgtg acaagacca cacctgccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag cagaacccc 780
gaggtgacct gtgtggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag caggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
ctggacagcg acggcagctt ctctgtac agcaagctga ccgtggaca gagcagatgg 1260
cagcaggga acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg cctgcaca cactacacc 1320
cagaagagcc tgagcctgtc ccagggaag 1350

<210> 53
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 53
 gacatcgtga tgacccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcca gcgggccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcacaaga 180
 gaaagcggcg tgcccgaccg ctttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
 atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggtagccgc tcccagcgtg 360
 ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 54
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 54
 gacatcgtga tgacccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcca gcgggccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
 gacagcggcg tgcccgaccg ctttctggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
 atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggtagccgc tcccagcgtg 360

ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgccctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 55
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 55
 gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcca gcggggccacc 60
 atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagcccgg ccagtcccc aagctgtgta tctactgggc cagcgccaga 180
 gatagcggcg tgcccgtcg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
 atcagccggg tgcaggccga ggacctgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggtgggcgc tcccagcgtg 360
 ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgccctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 56
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> variante humanizada de VL

<400> 56

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccgacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 57
<211> 657
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 57
gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 58
<211> 657
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 58
gacatcgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggaggccgc tccagcgtg 360
ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 59
<211> 657
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> variante humanizada de VL

<400> 59
gacatcgtga tgacccagag ccccgatagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
atcaactgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
gatagcggcg tgcccgaccg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
atcagctccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

cggaacctcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cggaggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 60
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR optimizada

<400> 60
cagtccctgt tcaactcccg gaccggaag aactac 36

<210> 61
<211> 9
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR optimizada

<400> 61
tgggcctct 9

<210> 62
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> CDR optimizada

<400> 62
atgcagtct tcaacctgcg gacc 24

<210> 63
<211> 24
<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 63
gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 64
<211> 22
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 64
aggactcggtt tgtacccggt ga 22

<210> 65
<211> 26
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 65
tgcagattgg ctacccaact gttgca 26

<210> 66
<211> 22
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 66
ctccttcatac ctcttgaaa tc 22

<210> 67
<211> 22
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 67
ccaaggaaag catagaggat gg 22

<210> 68
<211> 22
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 68
gtggtcatta tctatgcctt gg 22

<210> 69
<211> 22

<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 69
cgaccctgct gtataagatg ac 22

<210> 70
<211> 25
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 70
tattcctgct gagcctgctg ggaaa 25

<210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 71
gggttcacct tcactgataa ctac 24

<210> 72
<211> 30
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 72
attagaaaca aagctaattgg ttacacaaca 30

<210> 73
<211> 33
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 73
gcaagagatg tcggttccaa ctactttgac tac 33

<210> 74
<211> 36
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 74
cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

<210> 75

<211> 9
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 75
tgggcatcc 9

<210> 76
<211> 24
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 76
atgcaatctt ttaatcttcg gacg 24

<210> 77
<211> 100
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 77

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 78

<211> 101
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 78

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro
 100

<210> 79
<211> 100
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 79

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg
100

<210> 80
<211> 101
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 80

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ile Glu Phe Pro
100

<210> 81
<211> 15

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 81

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 82

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 83
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 84
<211> 219
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85
<211> 120
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa es His o Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> Xaa es Val o Leu

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa es Arg o Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa es Ala o Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa es Asp o Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)..(81)
<223> Xaa es Ala o Leu

<400> 85

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

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

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

Gly Xaa Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Xaa Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 112
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Leu o Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa es Ile o Met

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> Xaa es Asp o Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> Xaa es Leu o Gln

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa es Tyr o Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa es Ala o Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(66)
<223> Xaa es Asp o Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa es Ser o Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa es Gly o Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa es Asp o Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(89)
<223> Xaa es Val o Leu

<400> 86

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

Glu Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser Gly Val
50 55 60

Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

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

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

<210> 87
<211> 120

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 88

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

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

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

354045

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val

505560

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65707580

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

859095

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

100105110

<210> 89
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa es His o Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> Xaa es Val o Leu

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa es Arg o Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa es Ala o Asp

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa es Asp o Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)..(81)

<223> Xaa es Ala o Leu

<400> 89

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

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

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

Gly Xaa Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Xaa Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405

410

415

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

420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435440445

Gly

<210> 90

<211> 219

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es Leu o Ser

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es Ile o Met

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> Xaa es Asp o Ala

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> Xaa es Leu o Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (59)..(59)

<223> Xaa es Tyr o Ala

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa es Ala o Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (66)..(66)
<223> Xaa es Asp o Ala

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa es Ser o Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa es Gly o Glu

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa es Asp o Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(89)
<223> Xaa es Val o Leu

<400> 90

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

Glu Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Xaa Arg Xaa Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 91
<211> 449
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275280285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290295300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305310315320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325330335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340345350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355360365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370375380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385390395400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405410415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420425430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435440445

Gly

<210> 92
<211> 219
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 93
<211> 360
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 93
gaggtagagt tgggtgaatc tgggggtggc ctgggtcagc cagggtgggtc attgaagctg 60
agctgtgccg cttctggatt cacattcact gataactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
agcggcaaag gcctggaatg ggtggggacgc atacggaaca aggccaacgg ctataccaca 180
gcttatgcag catcagtcaa gggcagattt actatcagtc gtgacgattc taaaaatact 240
gcctatctcc aatgaattc cctcaagacc gaggataccg cagtgtacta ctgcgctagg 300
gacgtaggat ccaattactt cgactactgg gggcagggaa ccacccttac agtgtccagt 360

<210> 94
<211> 336
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 94
gacatcgfta tgaccagac ccctctctca ctcccagtc ctcttgaga gcccgcattc 60
atatcctgta ggagtctca gagtctgttc aactccagga cacgtaaaaa ctacctggac 120
tggtacctgc agaaacccgg ccagagtcca caactgctga tctattgggc ctcttacaga 180
gcctcagggg tccccgatag attctctggg tccggcagcg gtaccgactt cactttgaag 240
attagccgcg tggaagctga agatgtgggt gtgtattatt gcatgcagag cttaaatctc 300
cggacatttg gccagggaac caaggtggag atcaag 336

<210> 95
<211> 1347
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 95
gaggtagagt tgggtgaatc tgggggtggc ctgggtcagc cagggtgggtc attgaagctg 60
agctgtgccg cttctggatt cacattcact gataactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
agcggcaaag gcctggaatg ggtggggacgc atacggaaca aggccaacgg ctataccaca 180

gcttatgcag catcagtcaa gggcagattt actatcagtc gtgacgattc taaaaatact 240
 gcctatctcc aaatgaattc cctcaagacc gaggataccg cagtgtacta ctgcgctagg 300
 gacgtaggat ccaattactt cgactactgg gggcagggaa ccacccttac agtgtccagt 360
 gcaagcacia aagggcctag cgttttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg cctgggctg cctgggaag gactacttc ccgagcccg gaccgtgtcc 480
 tggacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagacca cacctgcccc cctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720
 ccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacccc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacacc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctgttac agcaagctga ccgtggaca gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccaggc 1347

<210> 96

<211> 657

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 96

gacatcgta tgaccagac ccctctctca ctcccagta ctctggaga gcccgcatcc 60

atatctgta ggagttctca gactctgtc aactccagga cacgtaaaaa ctacctggac 120

tggtaacctgc agaaacccgg ccagagtcca caactgctga tctattgggc ctcttacaga 180

gcctcagggg tccccgatag attctctggg tccggcagcg gtaccgactt cactttgaag 240
attagccgcg tggaagctga agatgtgggt gtgtattatt gcatgcagag cttaatatc 300
cggacatttg gccagggaac caaggtggag atcaagcgta cggtggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

REIVINDICACIONES

1. Una cadena pesada de anticuerpo humanizado que tiene CDRs que consisten en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.

2. Una cadena pesada de anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 85 ó 87.

3. Una cadena pesada de anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 ó 91.

4. Una cadena liviana de anticuerpo humanizado que tiene CDRs que consisten en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dichas CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

5. Una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada porque comprende una región variable de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 86 u 88.

6. Una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, caracterizada porque comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90 ó 92.

7. Un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo humanizado comprende cadenas pesadas y livianas, en donde dicha cadena pesada que tiene CDRs consiste en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y en donde dicha cadena liviana que tiene CDR consiste en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dichas CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6 y dichas CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden, respectivamente, las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.

8. Un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 83, 85 ó 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 84, 86 u 88.

9. Un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 ó 91 y una cadena liviana de secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90 ó 92.

10. Un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la reivindicación 7, seleccionado del grupo que consiste en:

– anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena

pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 16;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 27;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 17;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 28;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 18;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 29;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 19;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 30;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena

pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 15;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 26;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 10 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 21 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 10 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 21 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena

pesada de secuencia SEQ ID No. 11 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 22 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 12 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 23 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 13 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 88;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 24 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 92;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 14;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 25;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena

pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 15;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 26;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 16;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 27;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 17;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 28;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 18;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 29;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena

pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 19;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 30;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 87 y una región variable de cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 20;

– un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia SEQ ID No. 91 y una cadena liviana de secuencia SEQ ID No. 31.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque está seleccionada entre los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican una cadena pesada de anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1, 2 ó 3;

b) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican una cadena liviana de anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 5 ó 6;

c) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifican un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10;

d) un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico tal como se define en a), b) o c);

e) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas con al menos una de las 3 CDR de una cadena pesada

que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID Nos. 38 a 41, 49 a 52, 93 ó 95; y

f) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas con al menos una de las 3 CDR de una cadena liviana que comprende las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID Nos. 42 a 48, 53 a 59, 94 ó 96.

12. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende un ácido nucleico secuencia seleccionado del grupo que consiste en:

– una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos de CDR–H1 de SEQ ID No. 32, una secuencia de nucleótidos de CDR–H2 de SEQ ID No. 33 y una secuencia de nucleótidos de CDR–H3 de SEQ ID No. 34;

– una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena liviana de un anticuerpo humanizado, en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana comprende una secuencia de nucleótidos de CDR–L1 de SEQ ID No. 35 ó 60, una secuencia de nucleótidos de CDR–L2 de SEQ ID No. 36 ó 61 y una secuencia de nucleótidos de CDR–L3 de SEQ ID No. 37 ó 62; y

– una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana de un anticuerpo humanizado,

i) en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos de CDR–H1 de SEQ ID No. 32, una secuencia de nucleótidos de CDR–H2 de SEQ ID No. 33 y una secuencia de nucleótidos de CDR–H3 de SEQ ID No. 34; y

ii) en donde dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena liviana comprende una secuencia de nucleótidos de CDR–L1 de SEQ ID No. 35 ó 60, una secuencia de nucleótidos de CDR–L2 de SEQ ID No. 36 ó 61 y una secuencia de nucleótidos de CDR–L3 de SEQ ID No. 37 ó 62.

13. Un vector compuesto por un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12.

14. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 13.

15. Un animal transgénico, excepto el hombre, que comprende una célula transformada por un vector de acuerdo con la reivindicación 14.

16. Un método para producir un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

- el cultivo en un medio de cultivo y las condiciones de cultivo apropiadas para una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 14; y
- la recuperación de dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, producidos así del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

17. Un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10, para usar como un fármaco.

18. Una composición que comprende como un ingrediente activo un compuesto que consiste en una cadena pesada de anticuerpo humanizado de

acuerdo con la reivindicación 1 a 3 y/o una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6.

19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende como ingrediente activo un compuesto que consisten en un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10 y 17.

20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, caracterizado porque comprende, además, como un producto de combinación para usar de modo simultáneo, separado o extendido, un anticuerpo antitumoral distinto de un anticuerpo dirigido contra CXCR4.

21. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizado porque comprende, además, como un producto de combinación o conjugación para usar de modo simultáneo, separado o extendido, un agente citotóxico/citostático, una toxina celular y/o un radioisótopo.

22. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 18 a 21, para usar como un fármaco.

23. Una cadena pesada de anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y/o un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 ó 17, y/o de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, para la prevención o el tratamiento del cáncer.

24. Cadenas pesadas y/o livianas de anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, y/o una composición de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizado porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado de cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de colon.

25. Un proceso de detección in vitro de la presencia y/o la ubicación de un tumor que expresa CXCR4 en un sujeto, en donde dicho proceso comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con una cadena pesada de anticuerpo humanizado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 a 6 y/o un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10 ó 17; y
- (b) detectar la unión de dicho anticuerpo con la muestra.

26. Un kit que comprende al menos una cadena pesada de anticuerpo humanizado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 y/o una cadena liviana de anticuerpo humanizado de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 a 6 y/o un anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 10 ó 17, en donde dicho anticuerpo está preferentemente rotulado.

REIVINDICACIONES A11. 34 PCT.

1. Un anticuerpo humanizado capaz de unirse específicamente a CXCR4, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque el dicho anticuerpo humanizado, o compuesto derivado de fragmento funcional del mismo, comprende cadenas pesada y ligera, dicha cadena pesada tiene CDR que consisten de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y la dicha cadena ligera tiene CDR que consisten de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde dicho CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 comprenden respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6, y dicho CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 comprenden respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 7, 8 y 9.
2. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 83, 85 o 87 y una región variable de cadena ligera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 84, 86 o 88.
3. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una cadena pesada de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 o 91 y una cadena ligera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90 o 92.

4. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste de:

5

- anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 11, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 16;

10

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 22, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 27;

15

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 11, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 17;

20

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 22, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 28;

25

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 11, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 18;

30

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID

No. 22, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 29;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 11, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 19;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 22, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 30;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 12, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 14;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 23, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 25;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 12, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 15;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 23, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 26;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 10, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 14;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 21, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 25;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 10, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 88;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 21, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 92;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 11, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 88;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 22, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 92;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de

- la secuencia SEQ ID No. 12, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 88;
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
5 comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 23, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 92;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
10 comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 13, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 88;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
15 comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 24, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 92;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
20 comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 14;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
25 comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 25;
 - un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque
30 comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 15;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 26;
5
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 16;
10
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 27;
15
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 17;
20
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 28;
25
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 18;
30
- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID

No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 29;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 19;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 30;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 87, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 20;

- un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 91, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 31.

5. Una molécula de ácido nucleico caracterizada porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;
- b) un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico como se define en a);
- c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaces de hibridación bajo condiciones altamente rigurosas con por lo menos uno de los 3 CDR de una

cadena pesada que comprende las secuencias de ácido nucleico SEQ ID Nos. 38 41, 49 a 52, 93 o 95; y

- d) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaces de hibridación bajo condiciones altamente rigurosas con por lo menos uno de los 3 CDR de una cadena ligera que comprende las secuencias de ácido nucleico SEQ ID Nos. 42 a 48, 53 a 59, 94 o 96.

6. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste de:

- una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos CDR-H1 de la SEQ ID No. 32, una secuencia de nucleótidos CDR-H2 de la SEQ ID No. 33 y una secuencia de nucleótidos CDR-H3 de la SEQ ID No. 34;
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado, dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos CDR-L1 de la SEQ ID No. 35 o 60, una secuencia de nucleótidos CDR-L2 de la SEQ ID No. 36 o 61, y una secuencia de nucleótidos CDR-L3 de la SEQ ID No. 37 o 62; y
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado,
- i) dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

nucleótidos CDR-H1 de la SEQ ID No. 32, una secuencia de nucleótidos CDR-H2 de la SEQ ID No. 33 y una secuencia de nucleótidos CDR-H3 de la SEQ ID No. 34; y

5 ii) dicha secuencia de nucleótidos de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos CDR-L1 de la SEQ ID No. 35 o 60, una secuencia de nucleótidos CDR-L2 de la SEQ ID No. 36 o 61, y una secuencia de nucleótidos CDR-L3 de la
10 SEQ ID No. 37 o 62.

7. Un vector compuesto de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.

15 8. Una célula anfitriona que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Un animal transgénico, excepto el hombre, que comprende una célula transformada por un de acuerdo con la
20 reivindicación 8.

10. Un método para producir un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque dicho método comprende las
25 siguientes etapas:

- el cultivo en un medio de y las condiciones de cultivo adecuadas para una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 8; y
- la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus
30 fragmentos funcionales, así producidos a partir del medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.

11. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, para uso como un fármaco.
- 5 12. Una composición que comprende como un ingrediente activo un compuesto que consiste de un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 y 11.
- 10 13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque comprende, adicionalmente, como un producto de combinación para uso en una forma simultánea, separada o extendida, un anticuerpo anti-tumor diferente de un anticuerpo dirigido contra XCR4.
- 15 14. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado porque comprende, adicionalmente, como un producto de combinación o conjugación para uso en una forma
- 20 simultánea, separada o extendida, un agente citotóxico /citoestático, una toxina celular y/o un radioisótopo.
15. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a o 13, para uso como un fármaco.
- 25 16. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 11, y/o de una composición de acuerdo con cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 16 a 18, para la prevención o tratamiento de cáncer.

17. Un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, y/o una composición de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizada porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado entre cáncer de próstata, osteosarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de colon.
18. Un proceso para detectar la presencia in vitro y/o la ubicación de un CXCR4 que expresa tumor en un sujeto, en donde dicho proceso comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 o 11; y
 - (b) detectar la unión de dicho anticuerpo con la muestra.
19. Un equipo que comprende por lo menos un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 o 11, dicho anticuerpo es preferiblemente etiquetado.

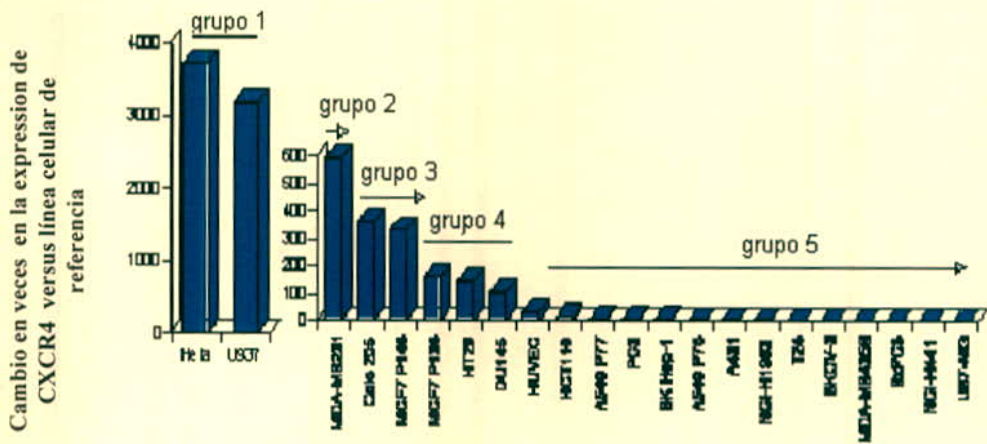


FIGURA 1A

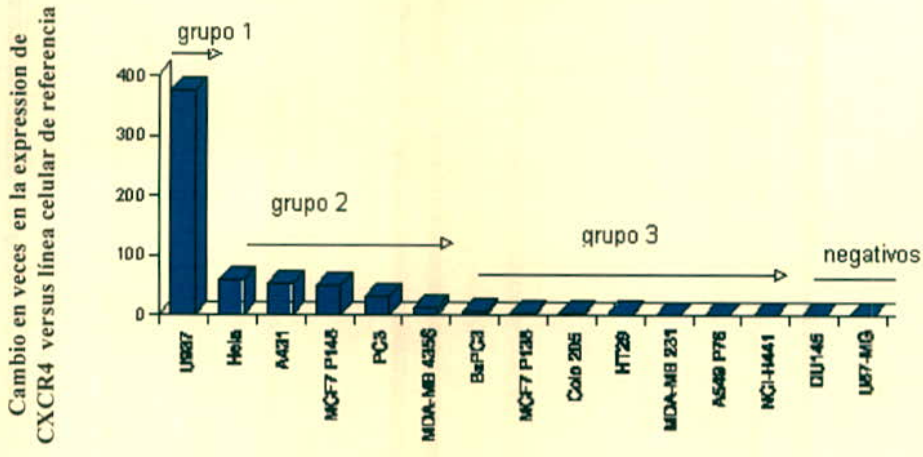


FIGURA 1B

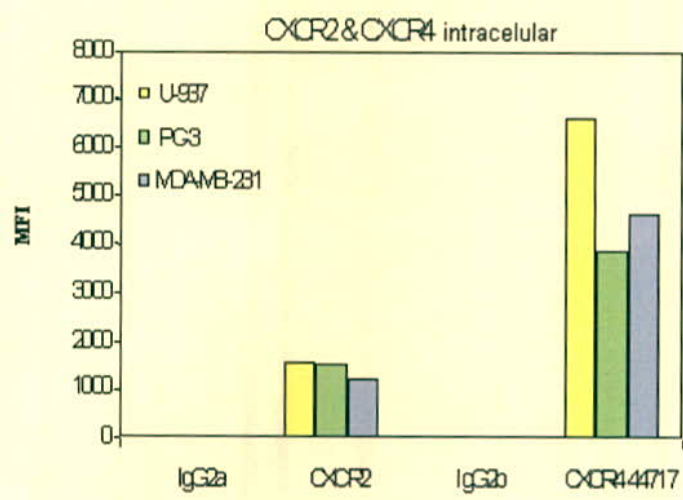


FIGURA 2

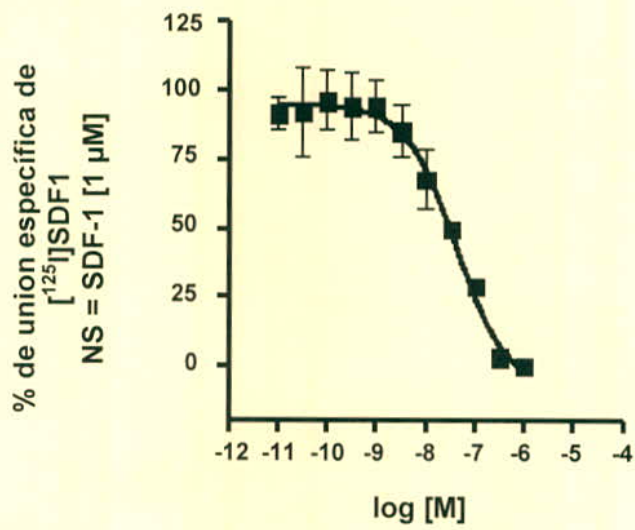


FIGURA 3A

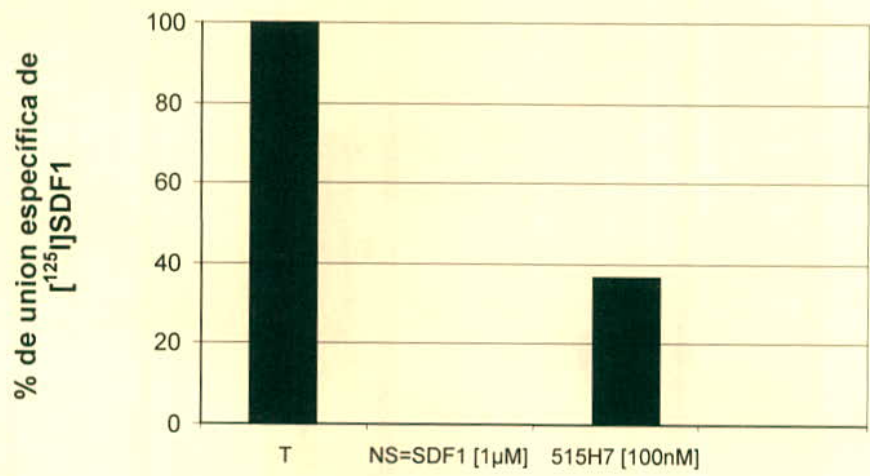


FIGURA 3B

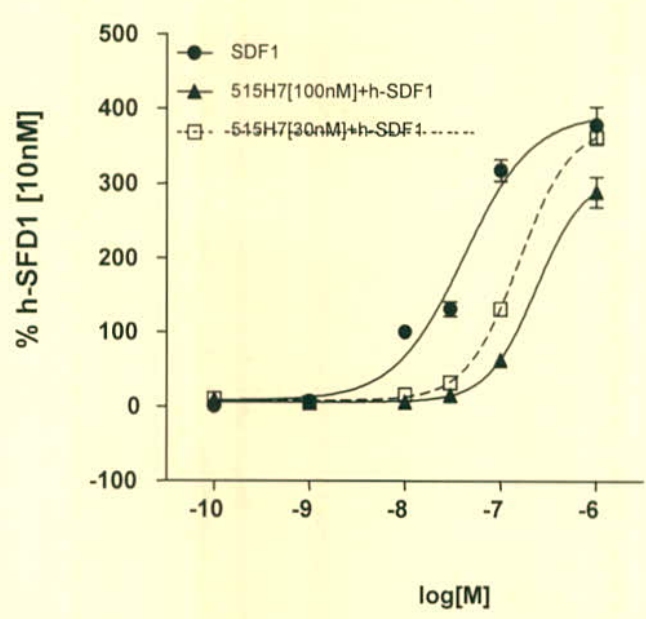


FIGURA 4

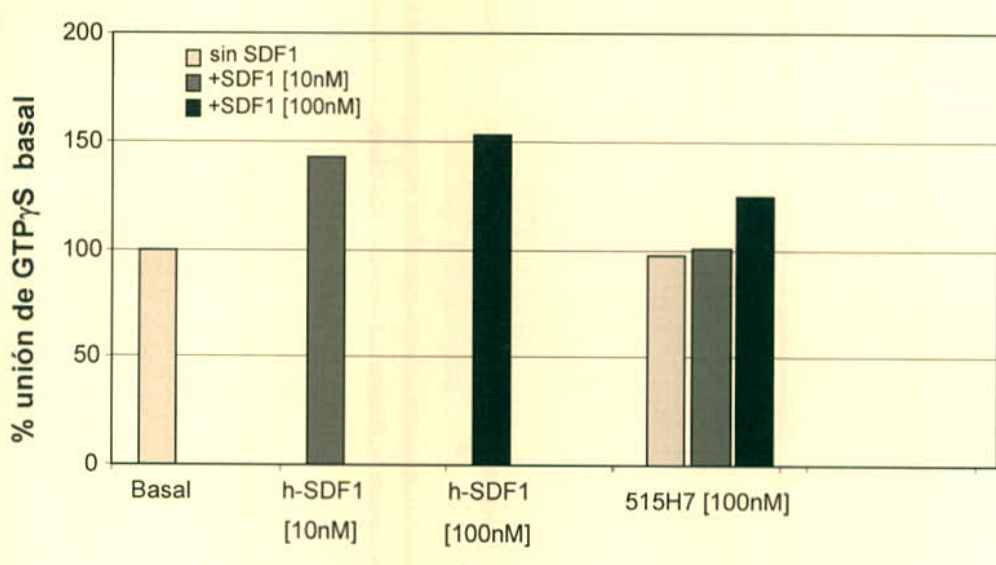


FIGURA 5

FIGURA 6A

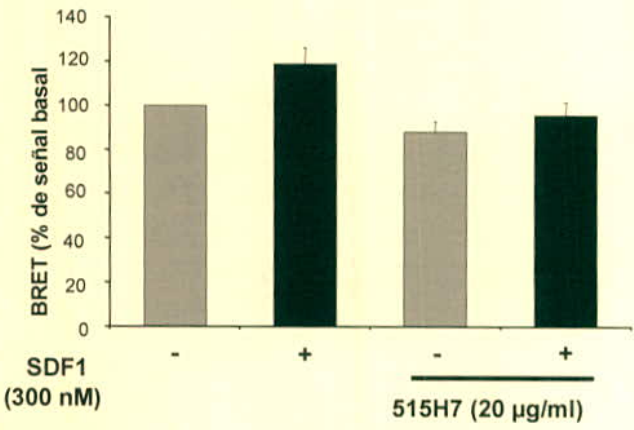


FIGURA 6B

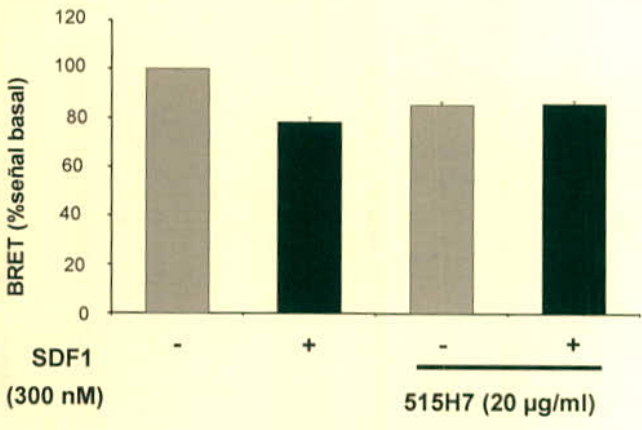
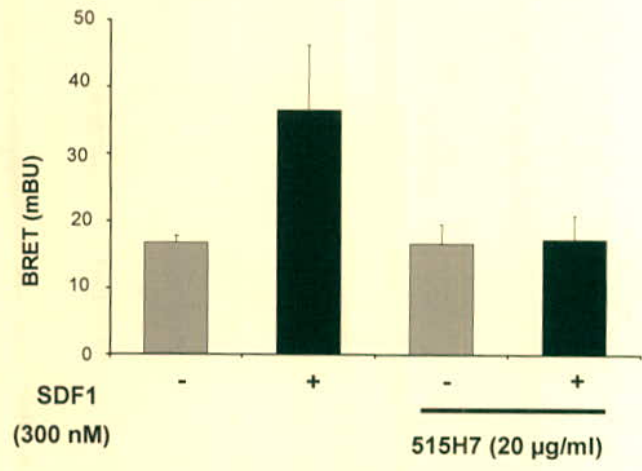


FIGURA 6C



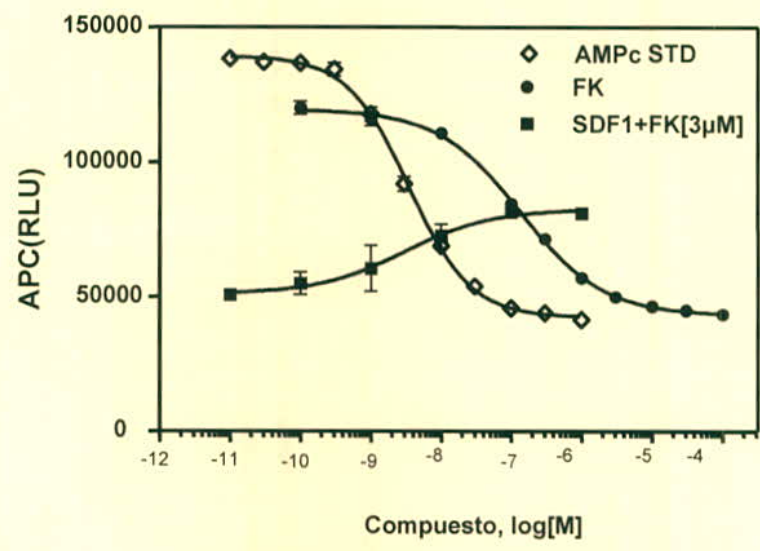


FIGURA 7A

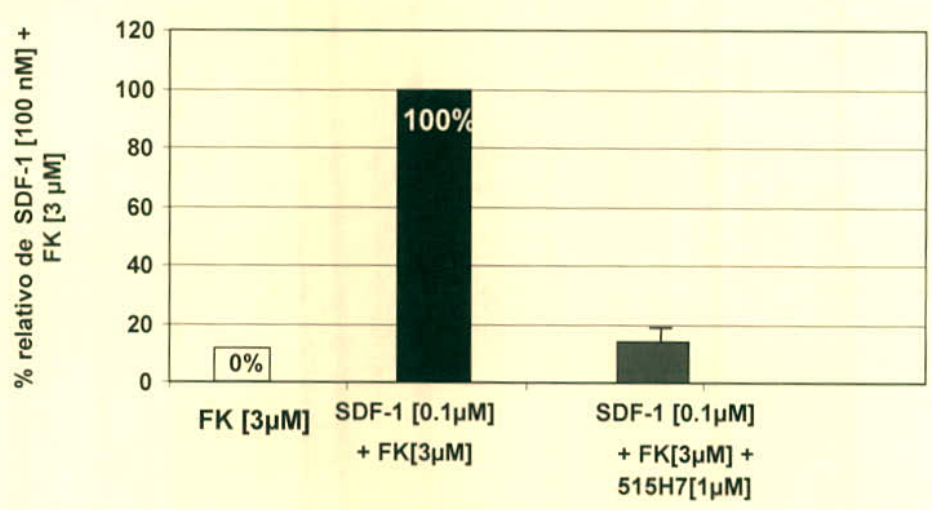


FIGURA 7B

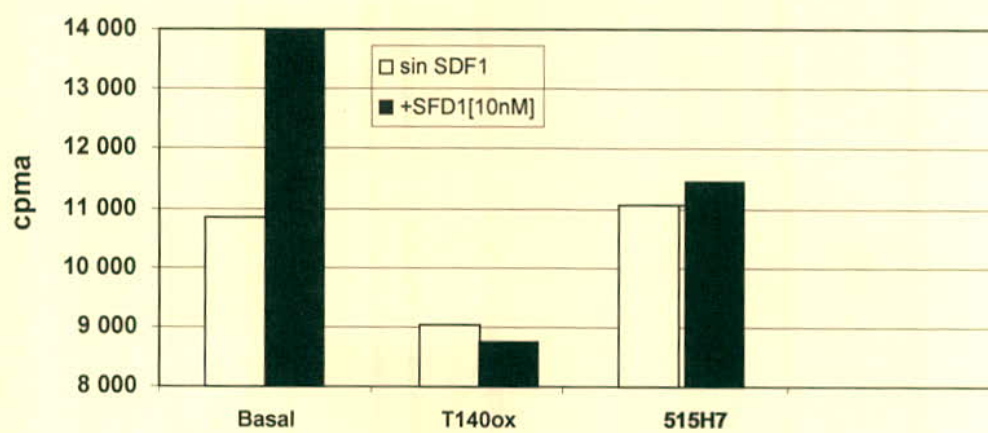


FIGURA 8

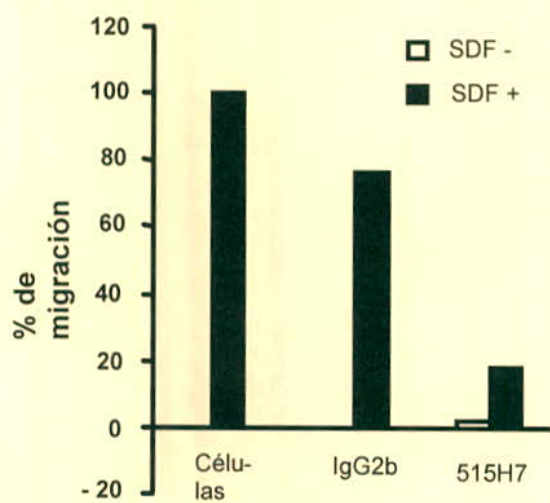


FIGURA 9

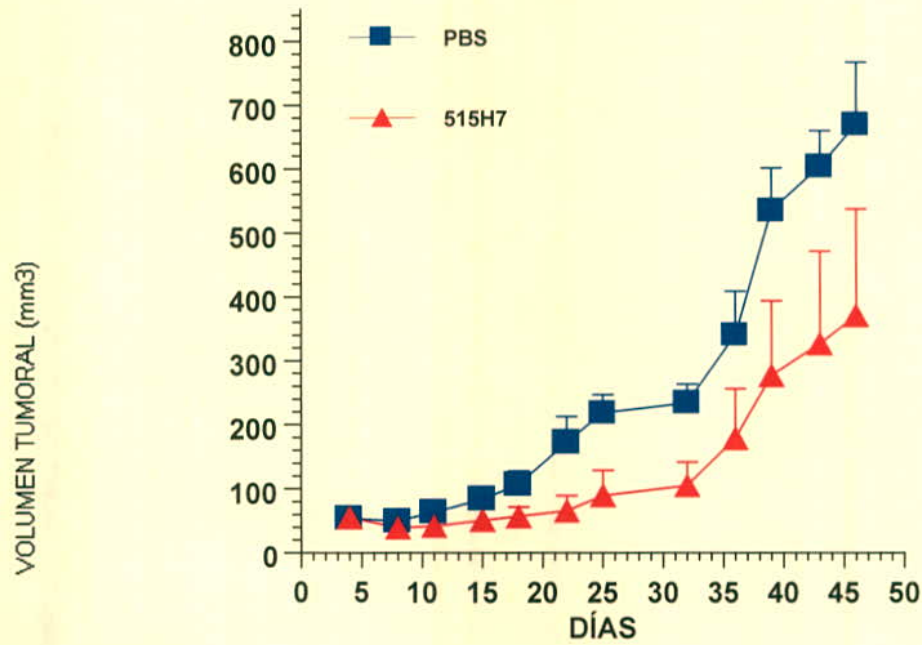


FIGURA 10

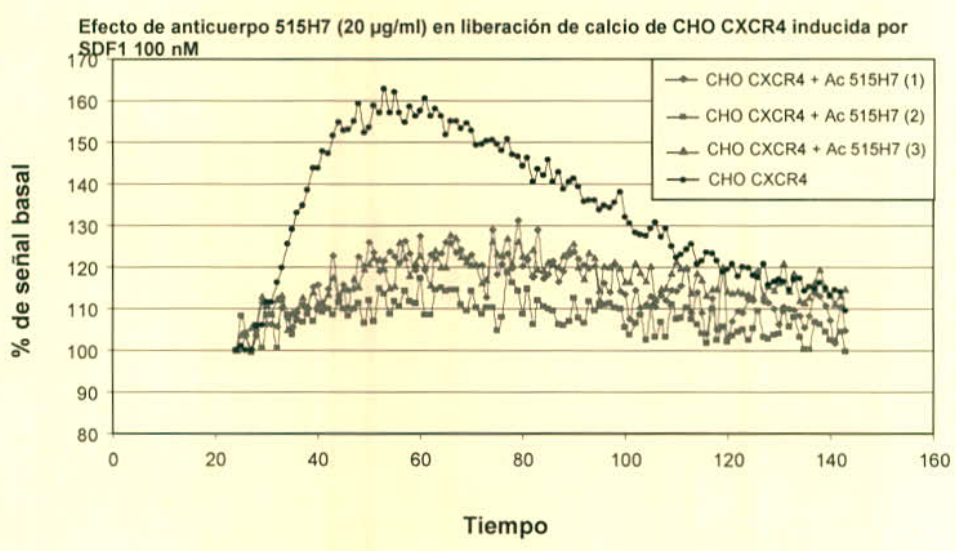


FIGURA 11A

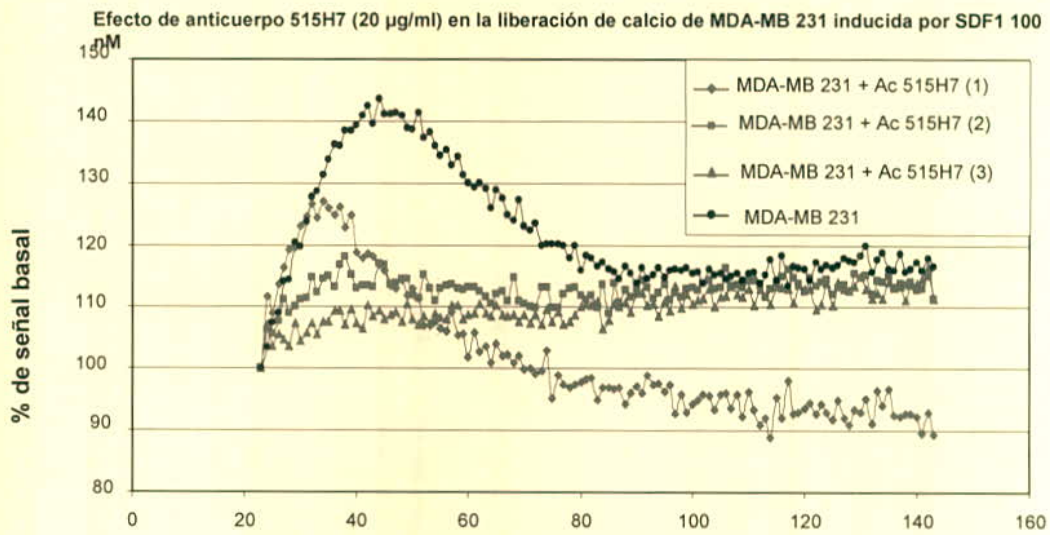


FIGURA 11B

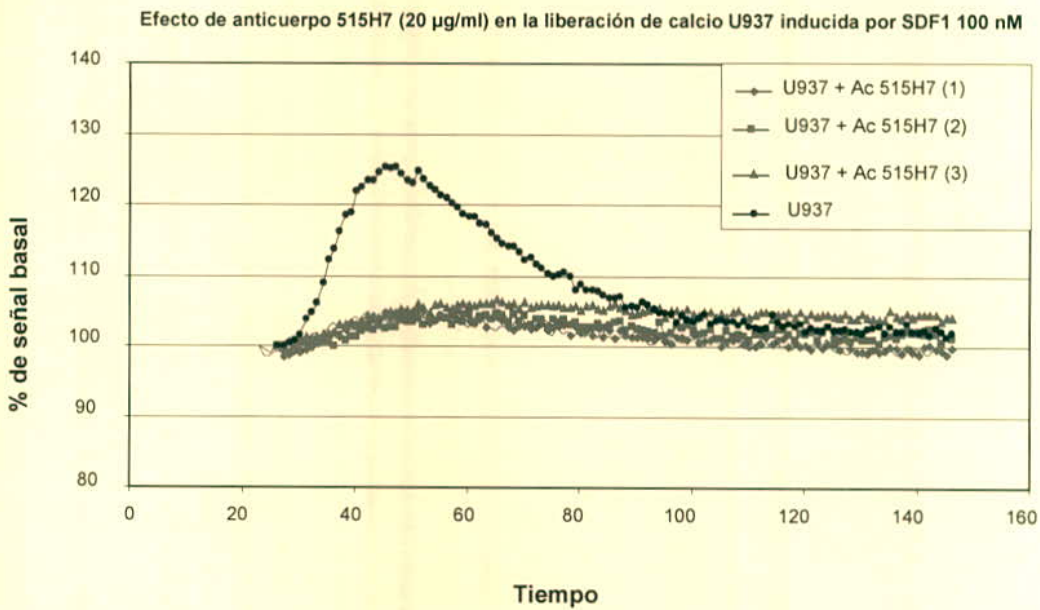


FIGURA 11C

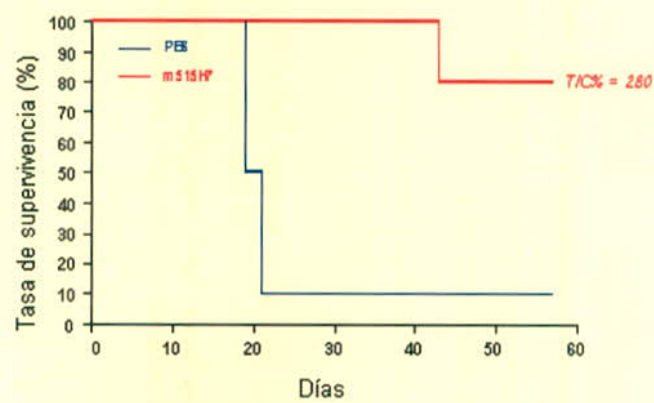


FIGURA 12

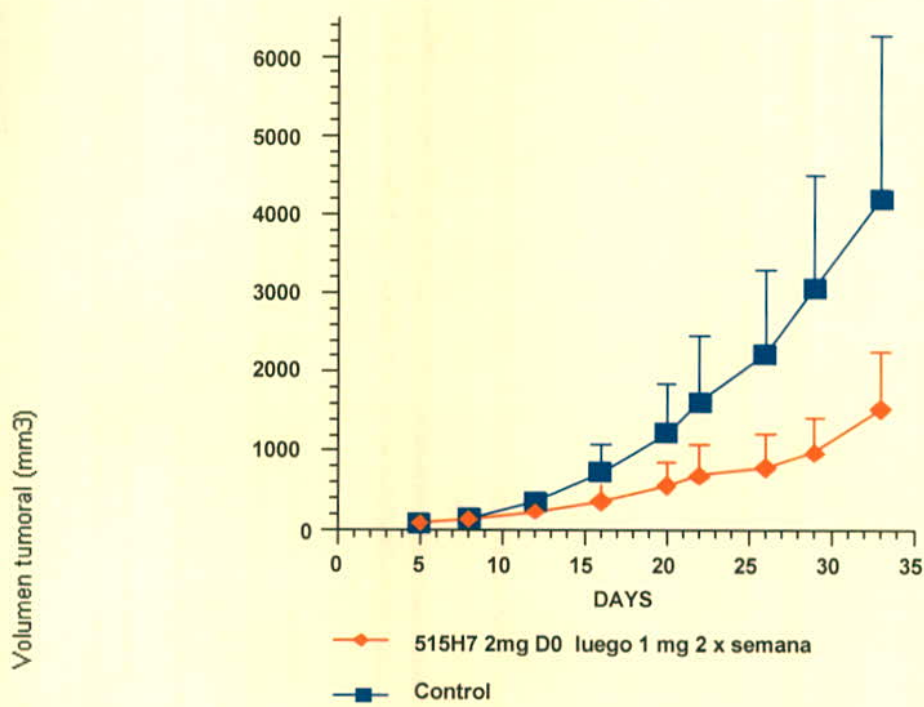


FIGURA 13

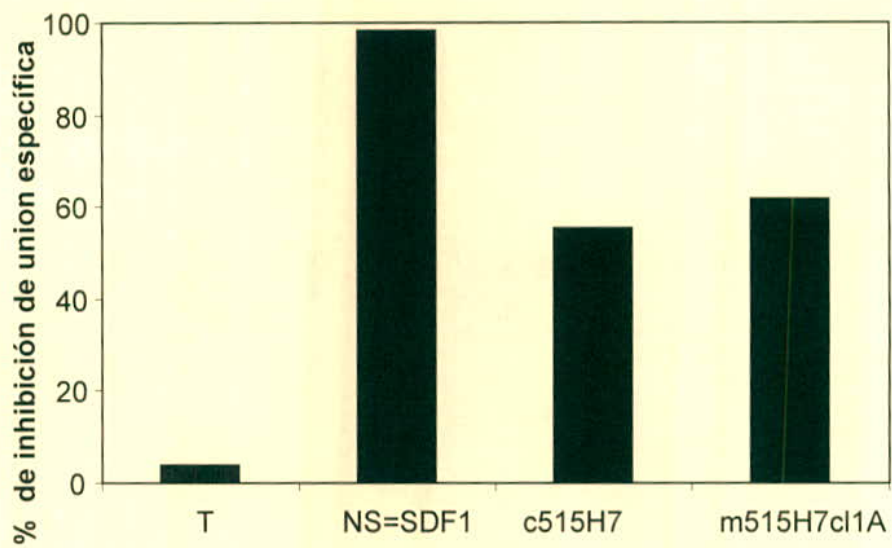


FIGURA 14

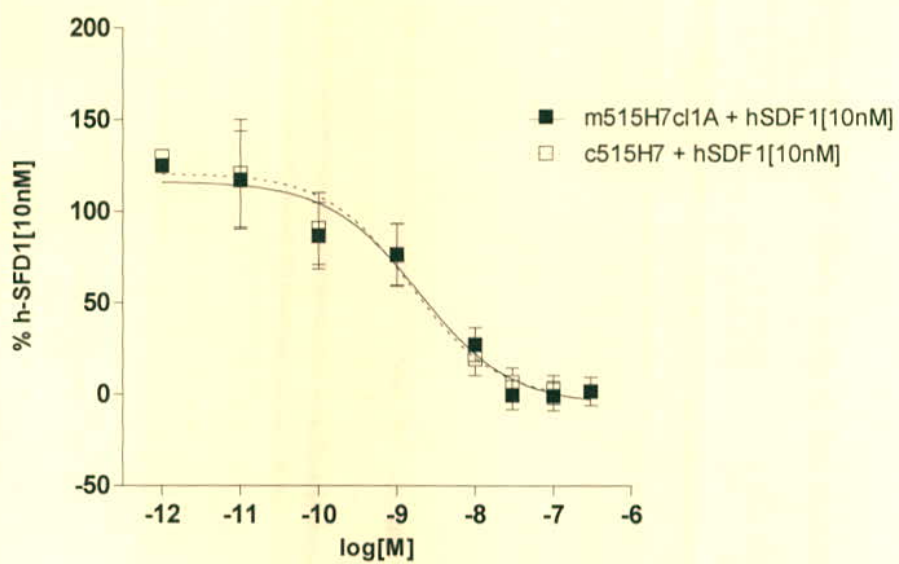


FIGURA 15

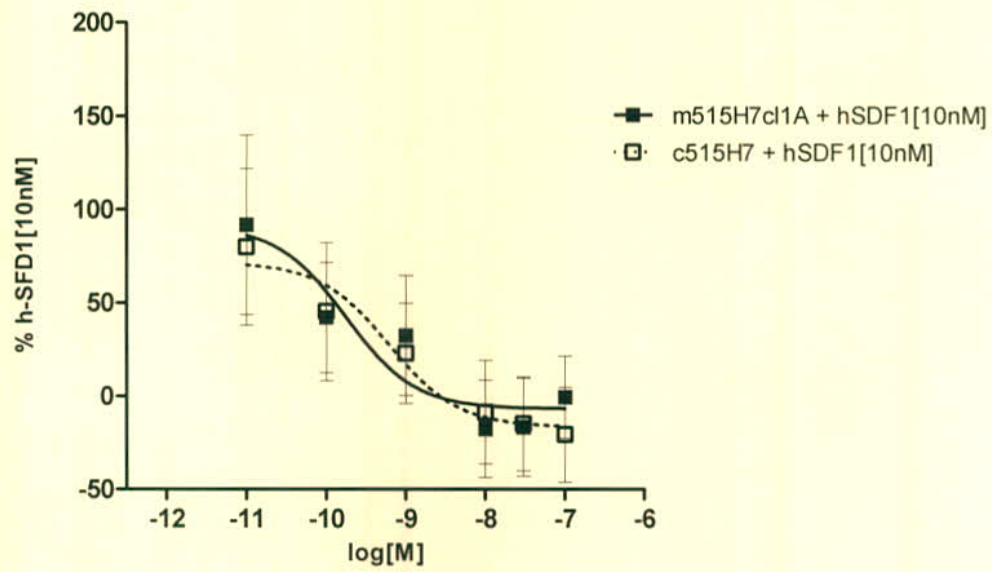


FIGURA 16

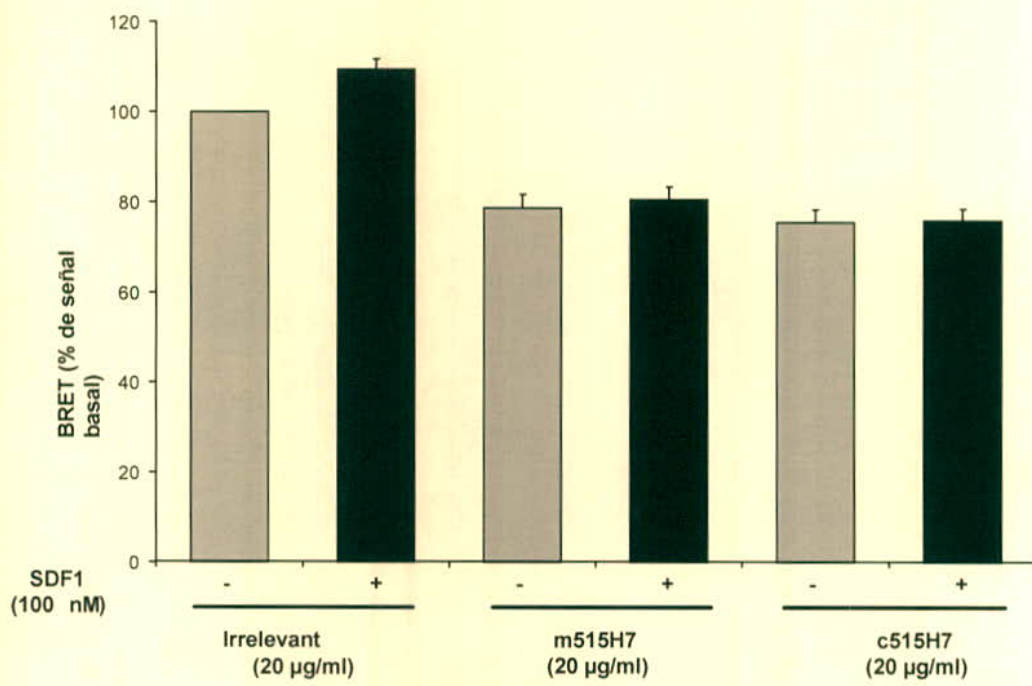


FIGURA 17A

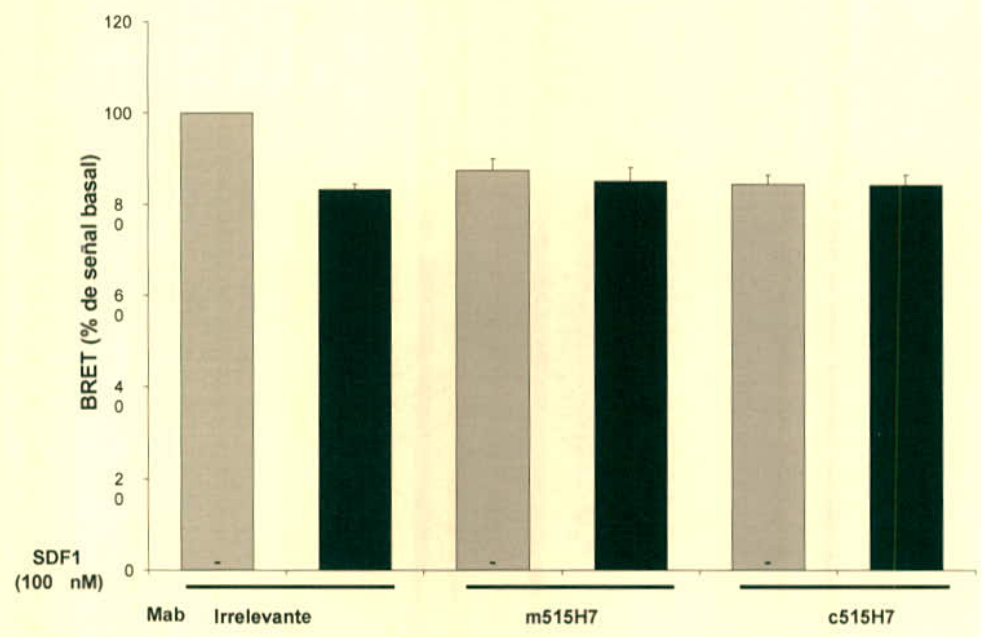


FIGURA 17B

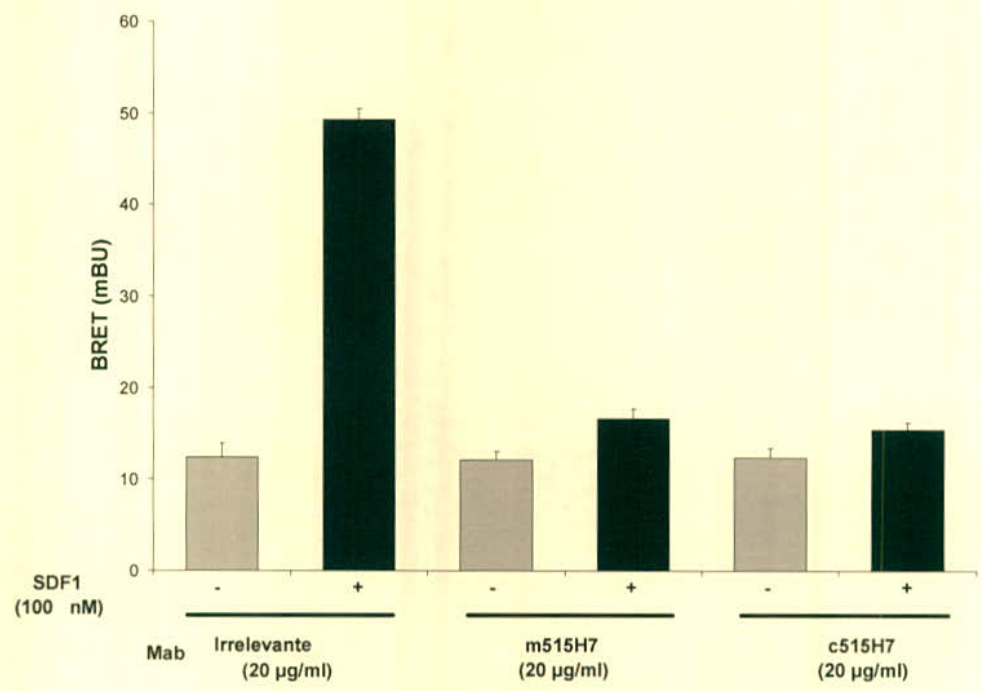


FIGURA 17C

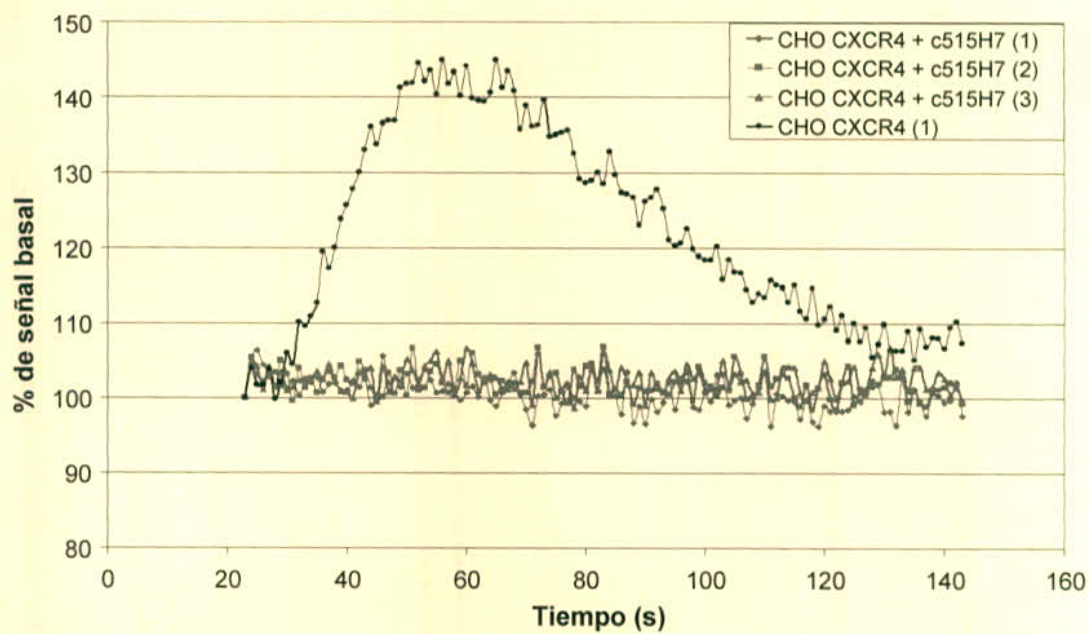


FIGURA 18A

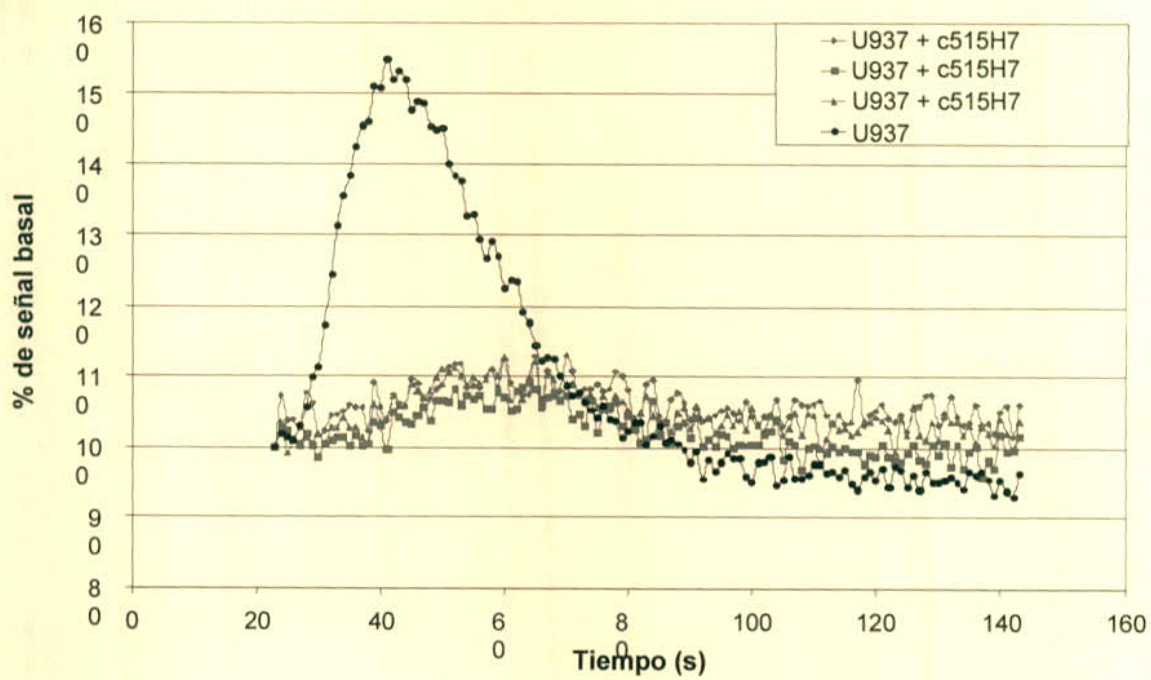


FIGURA 18B

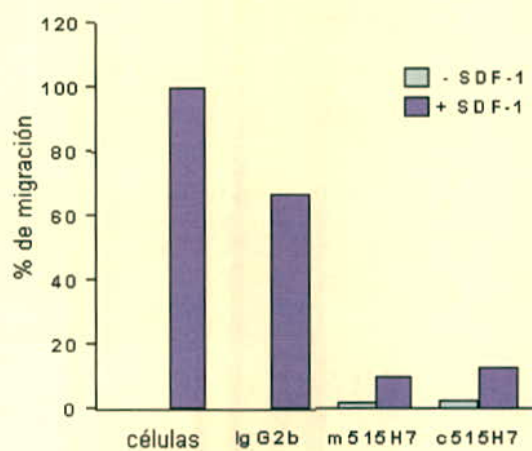


FIGURA 19

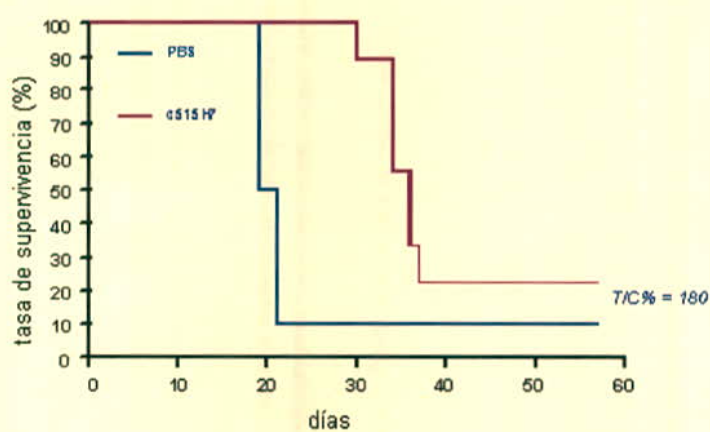


FIGURA 20

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VH												
IGHV3-49*04	EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCATS	GFTF...TDNY	MSWVRQPPGKALEWLGF	IRNKANGYTT								
	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...GDYA	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRSKAYGTT								
Priority	N	G	AT		P	A	L					
	2	3	33		3	3	1					
VH1	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...TDNY	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRNKANGYTT								
VH2	EVNLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...TDNY	MSWVRQAPGKGLEWLGF	IRNKANGYTT								
	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-115)			FR4-IMGT (116-125)					
	70	80	90	100								
515H7 VH												
IGHV3-49*04	DYSASVR.GRFTISRDNSSQILYLQMNALRAEDSATYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTTLTVSS									
IGHJ4*01	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC	TR										
								YFDYW	GQGTTLTVSS			
Prioridad	D S R	N Q L	A R A	S T						T		
	1 3 1	1 3 1	2 23	3 3						3		
VH1	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS									
VH2	DYAASVR.GRFTISRDNSSQILYLQMNALRTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS									

FIGURA 21

	FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-65)				
	1		10		20		30		40		50		60							
515H7 VL															WA.....S		S			
IGKV4-1*01	DIVMTQSPD		SLAVSLGERATIN		CKSS		QSLFNSRTRKNY		LAWYQQKPGQ		SPKLLIY		WA.....S		S		S			
Prioridad	S S		A KV MS								S		2							
	3 2		3 33 22																	
VL1	DIVMTQSPD		SLAVSLGERATIN		CKSS		QSLFNSRTRKNY		LAWYQQKPGQ		PPKLLIY		WA.....S							
VL3	DIVMTQSPD		SLAVSLGERATIN		CKSS		QSLFNSRTRKNY		LAWYQQKPGQ		PPKLLIY		WA.....S							
VL2	DIVMTQSP		SSLAVSLGERAT		MSCKSS		QSLFNSRTRKNY		LAWYQQKPGQ		SPKLLIY		WA.....S							

FIGURA 22

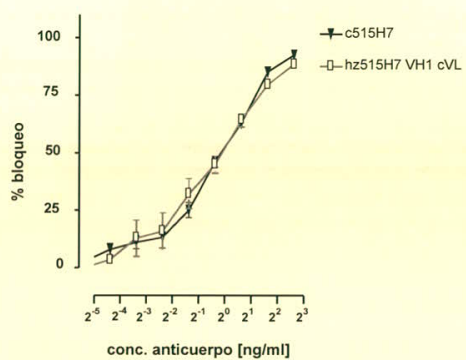


FIGURA 23A

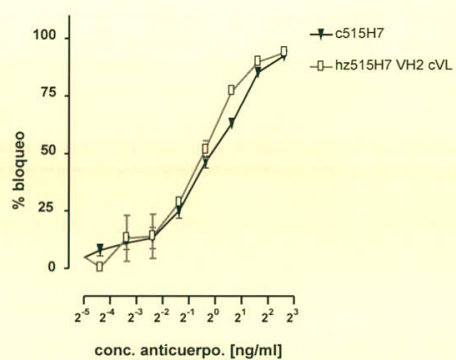


FIGURA 23B

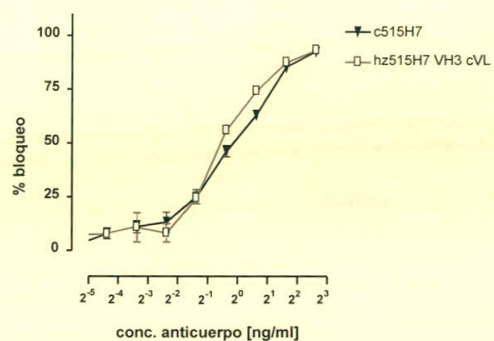


FIGURA 23C

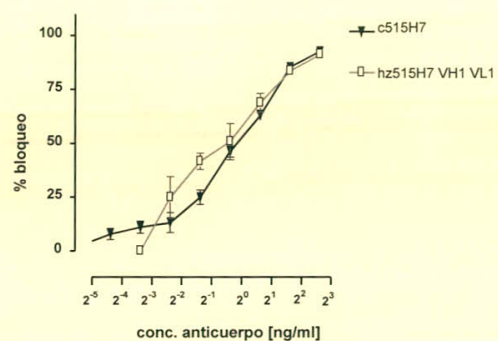


FIGURA 23D

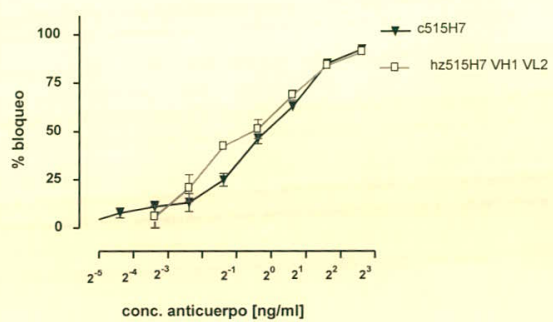


FIGURA 23E

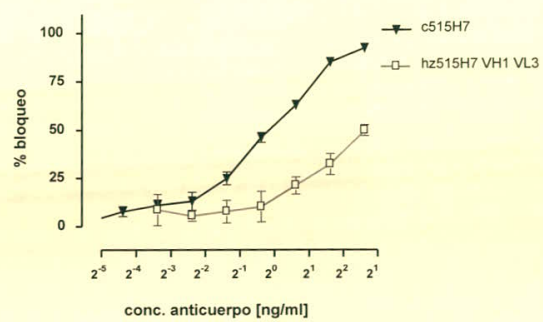


FIGURA 23F

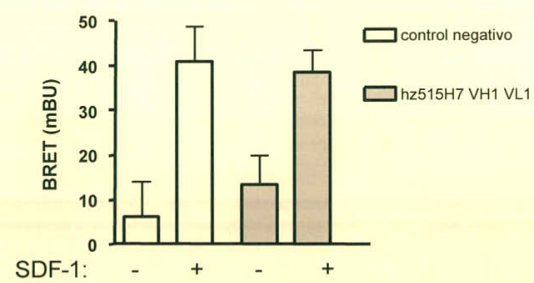
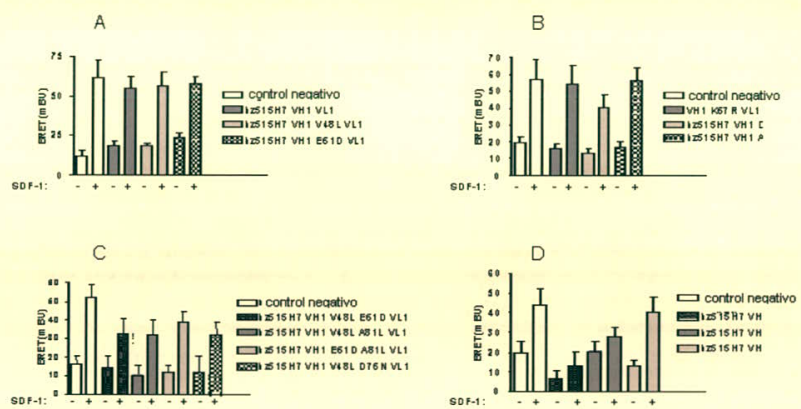


FIGURA 24



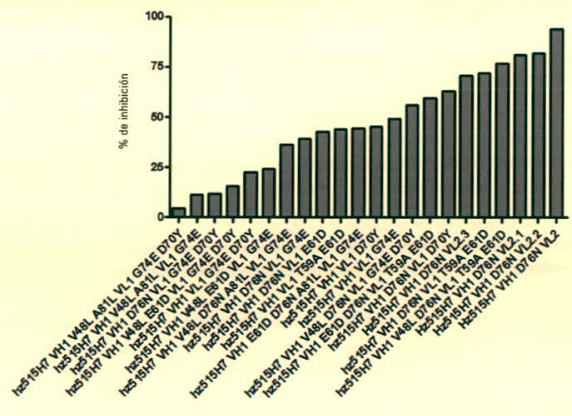


FIGURA 26

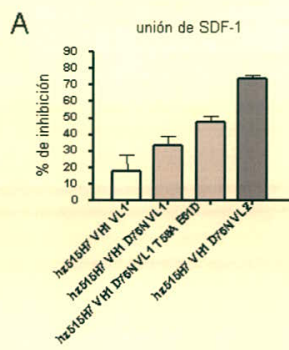


FIGURA 27A

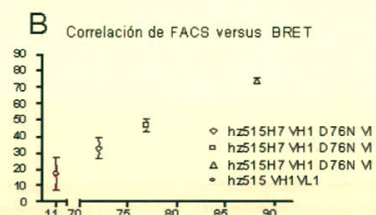


FIGURA 27B

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL												
IGKV4-1*01	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQSPKLLIY	WA.....S								
VL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	QSVLYSSNNKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S								
VL2.1	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQSPKLLIY	WA.....S								
VL2.2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S								
VL2.3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S								

	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (106-113)			FR4-IMGT (114-123)		
	70	80	90	100					
515H7 VL					MQSFNLRT	FGQGTKVEIK			
IGKV4-1*01	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	TRESGVP.DRFTGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC							
IGKJ1*01					WT	FGQGTKVEIK			
VL2	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK						
VL2.1	ARDSGVP.DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK						
VL2.2	ARDSGVP.DRFTGSG..SETYFTLTISRVAEDVAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK						
VL2.3	ARDSGVP.DRFTGSG..SETYFTLTISLQAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK						

FIGURA 28

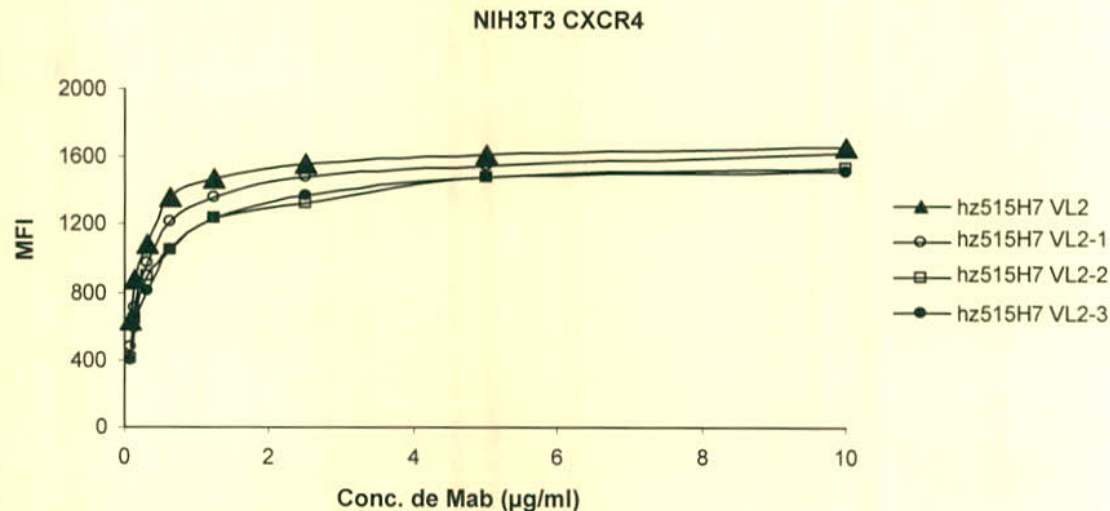


FIGURA 29A

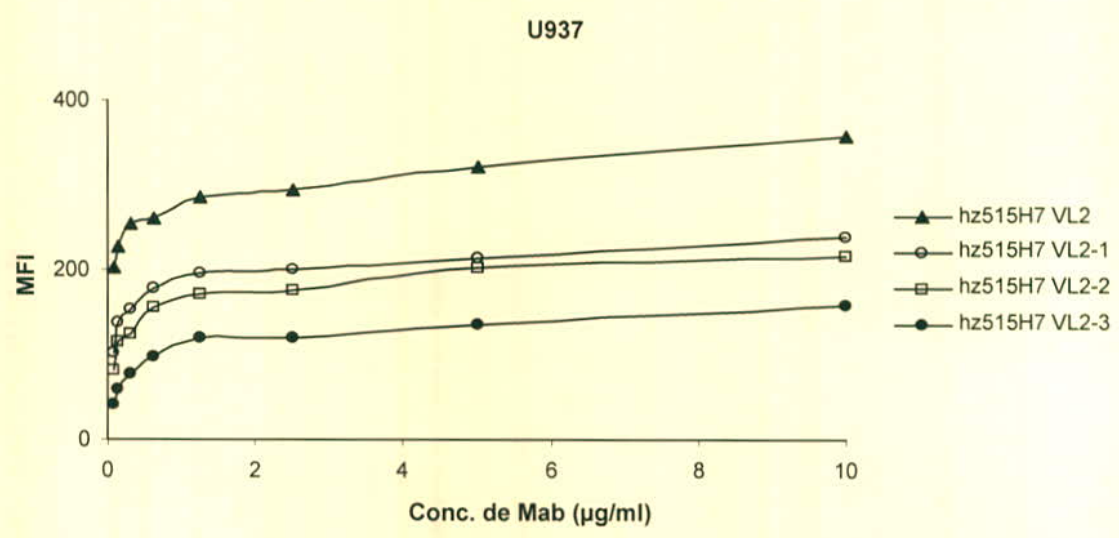


FIGURA 29B

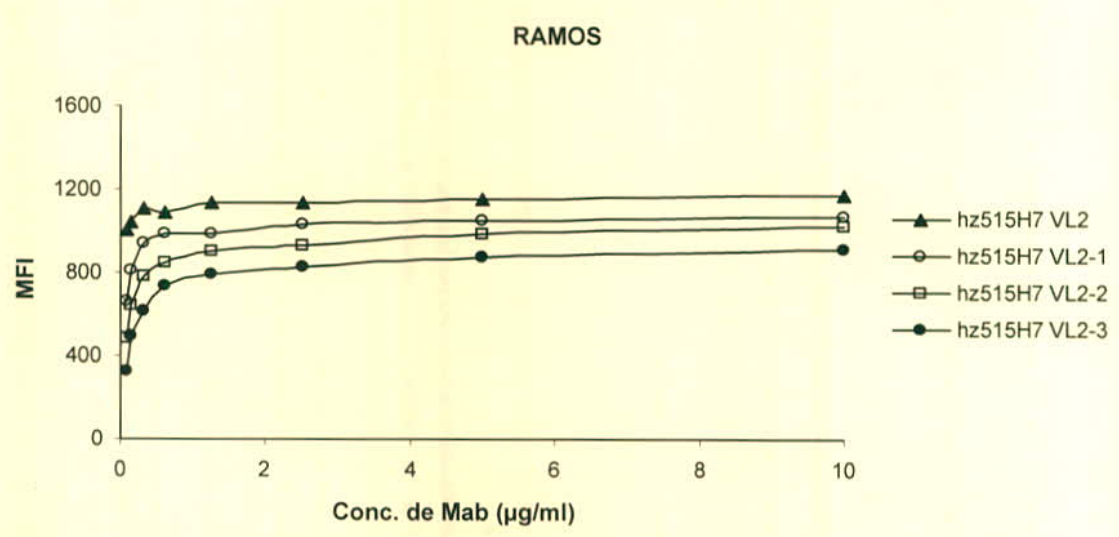


FIGURA 29C

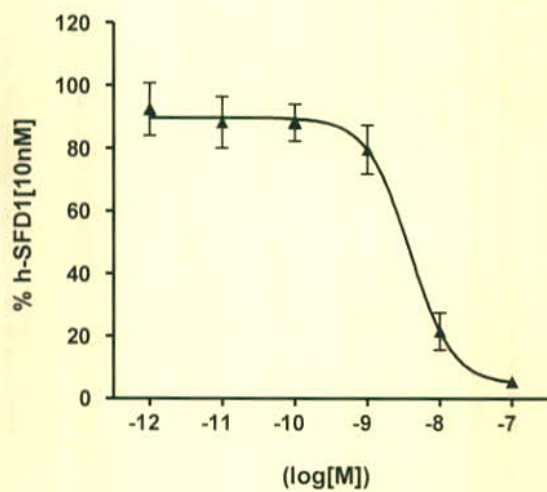


FIGURA 30A

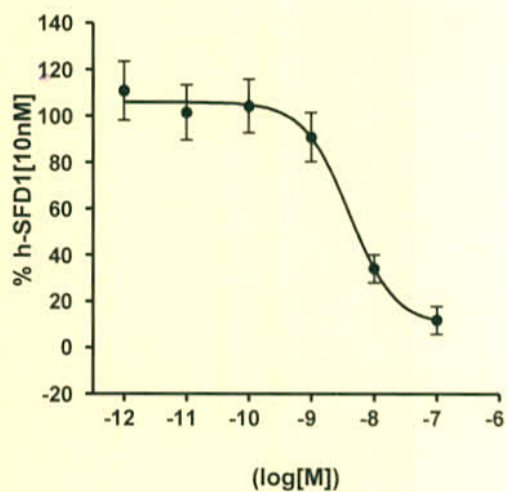


FIGURA 30B

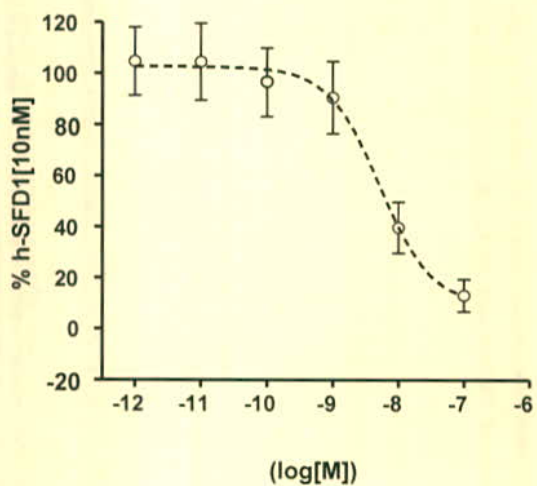


FIGURA 30C

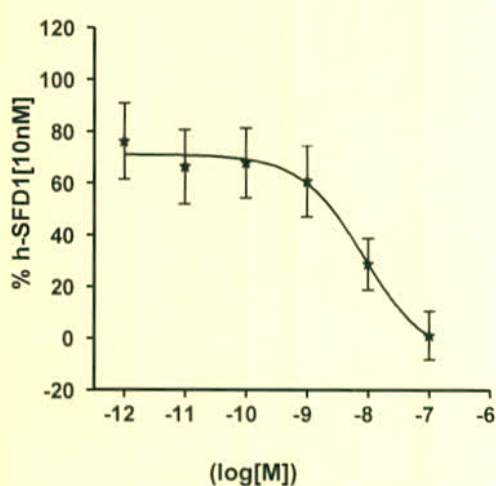


FIGURA 30D

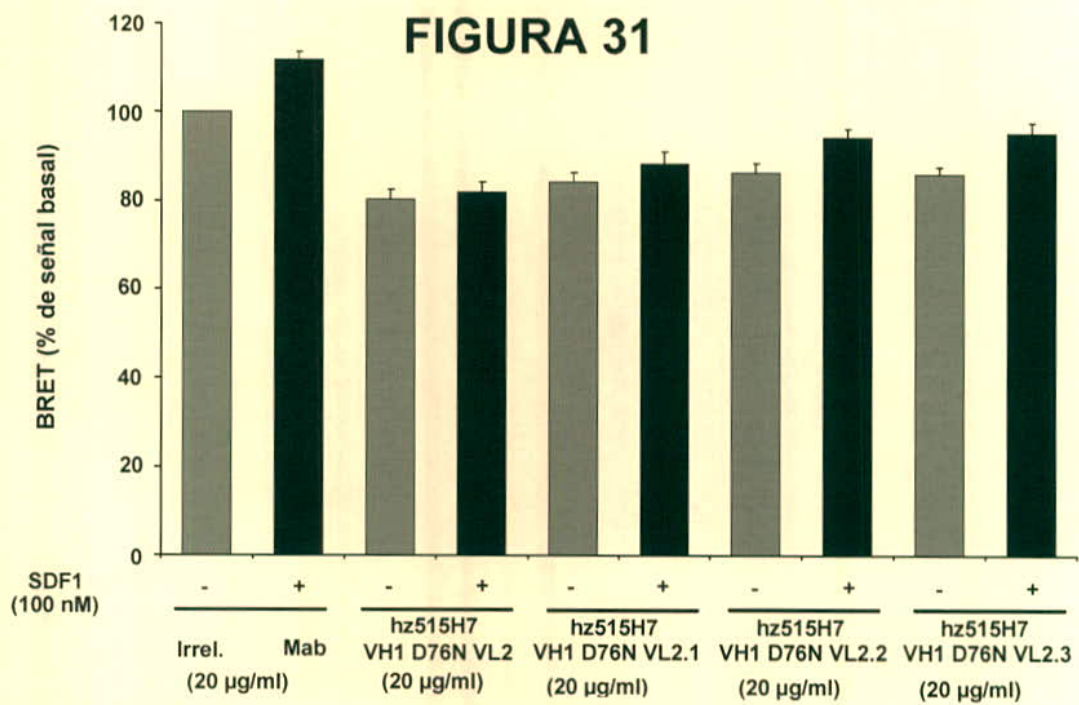
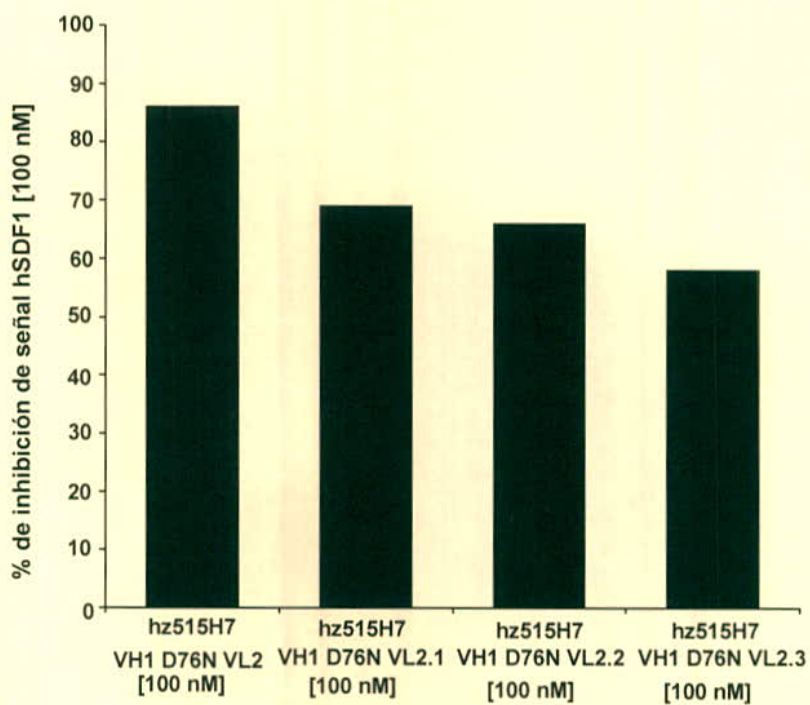


FIGURA 32A

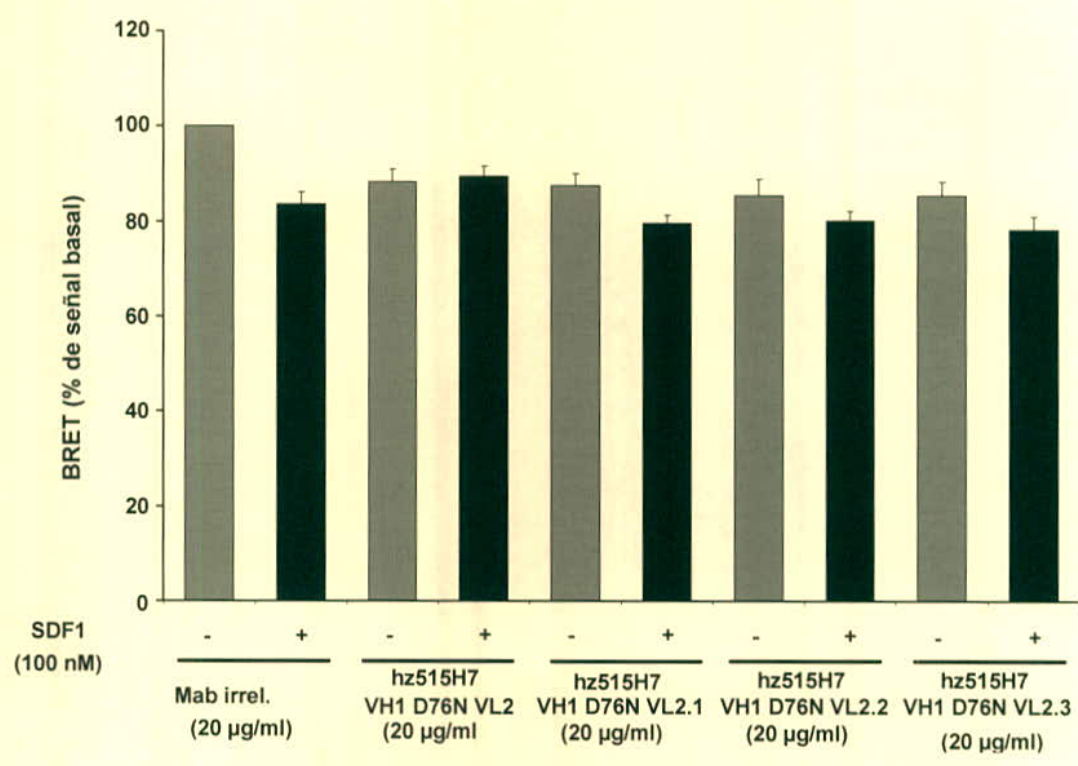


FIGURA 32B

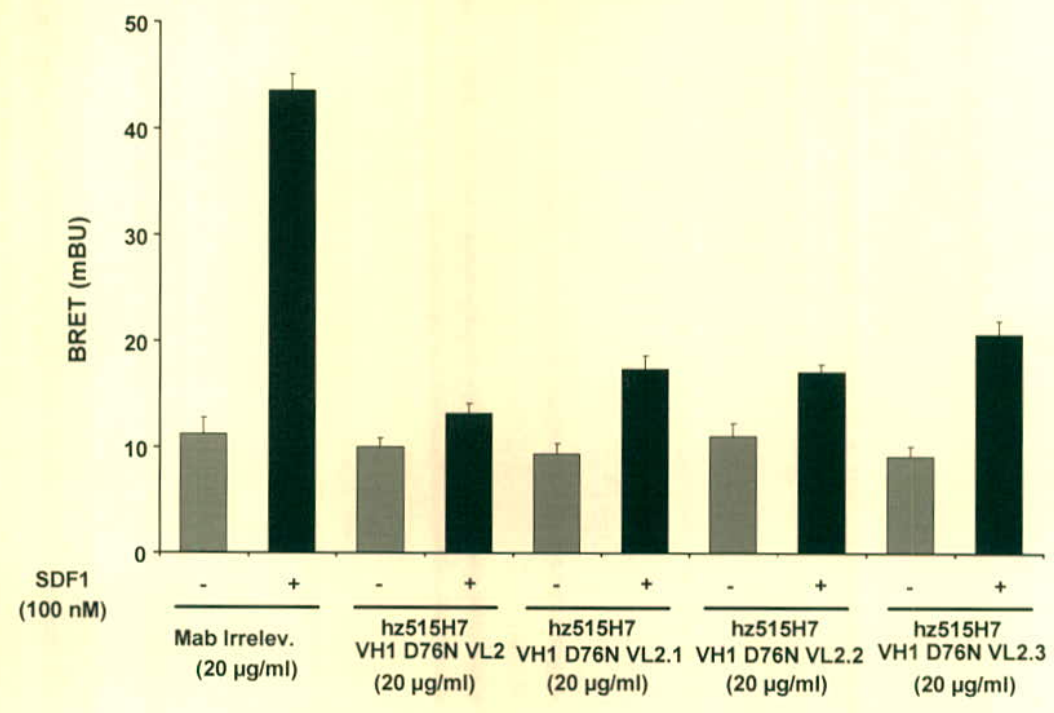


FIGURA 32C

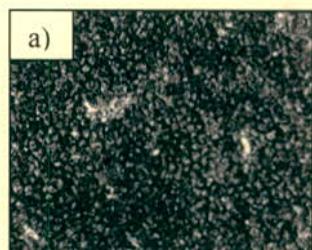


FIGURA 33A

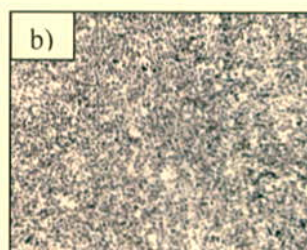


FIGURA 33B

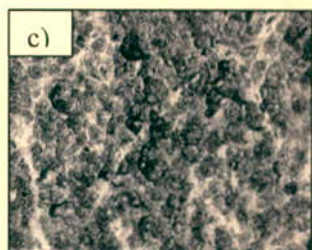


FIGURA 33C

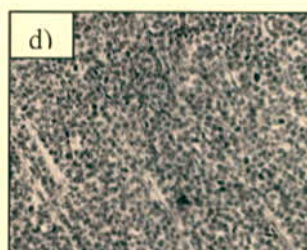


FIGURA 33D

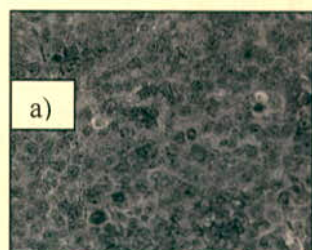


FIGURA 34A

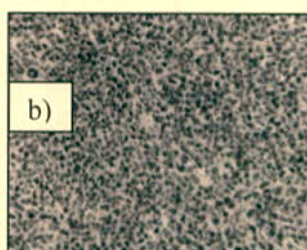


FIGURA 34B

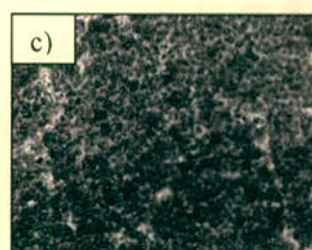


FIGURA 34C

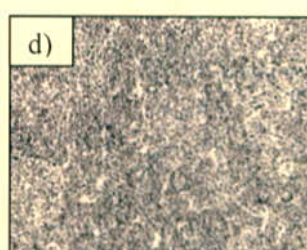


FIGURA 34D

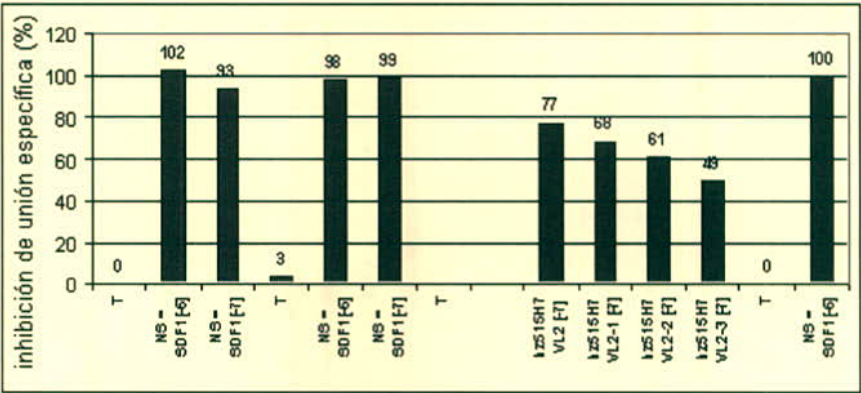


FIGURA 35A

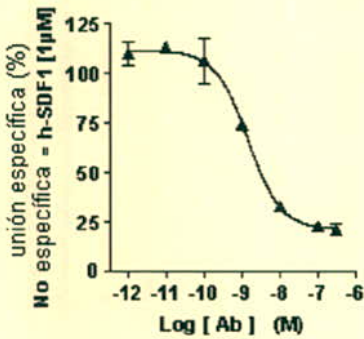


FIGURA 35B

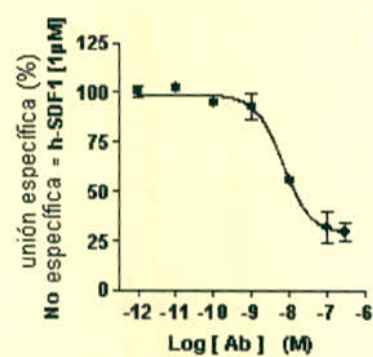


FIGURA 35C

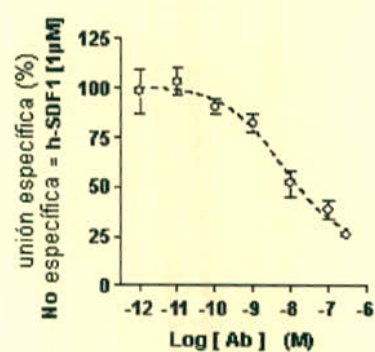


FIGURA 35D

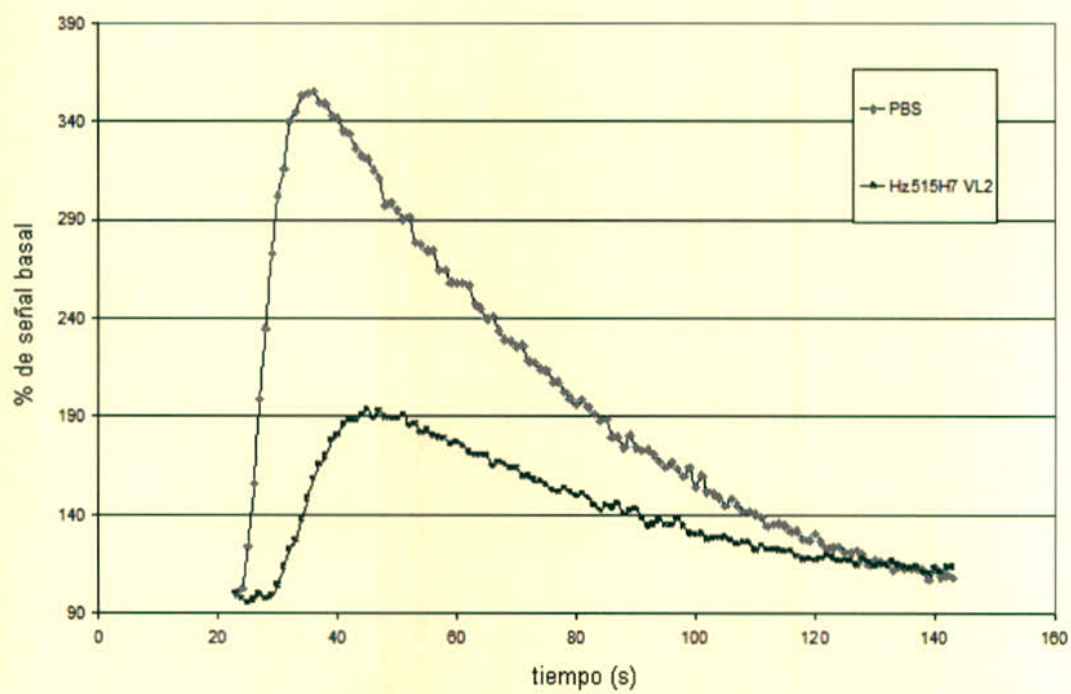


FIGURA 36

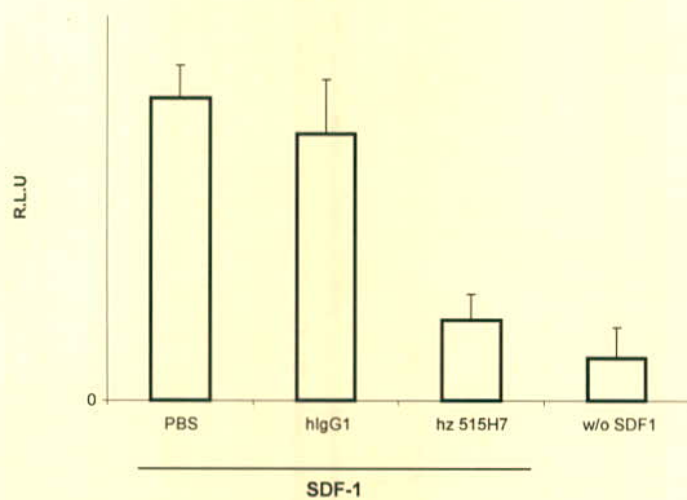


FIGURA 37A

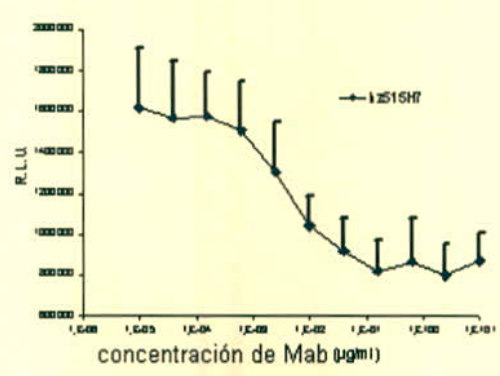


FIGURA 37B

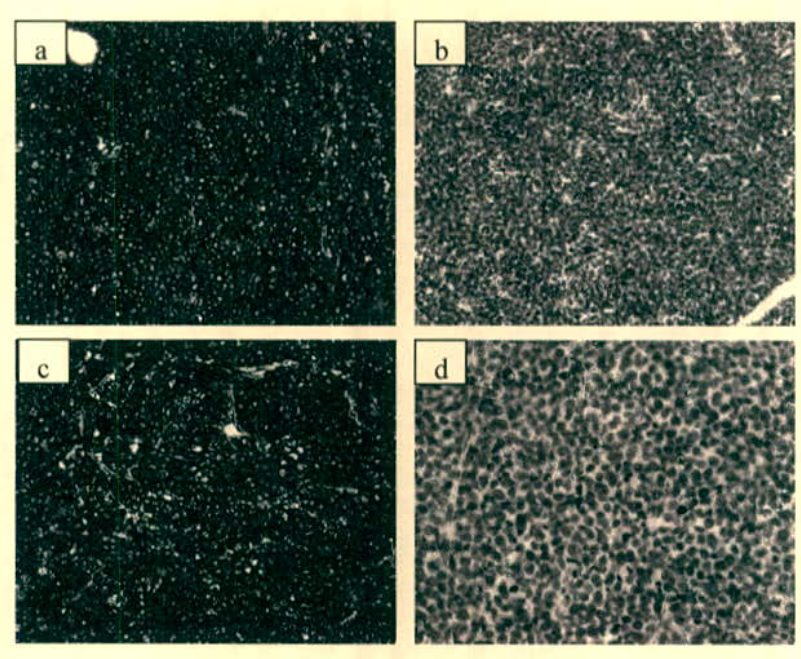
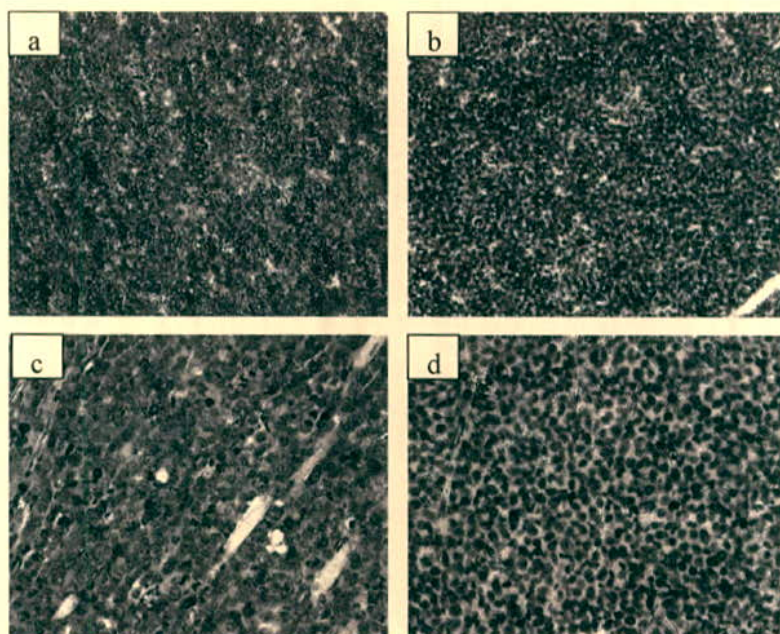
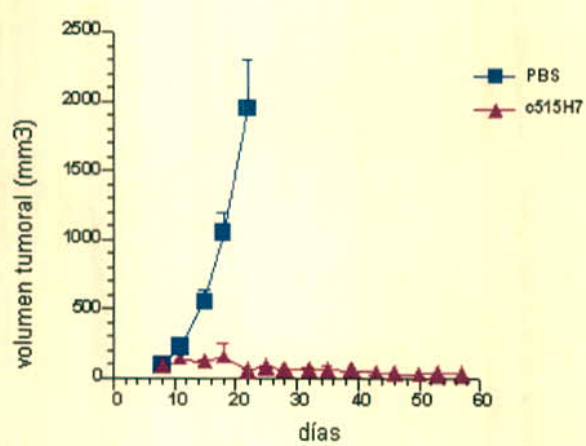


FIGURA 38

**FIGURA 39****FIGURA 40**

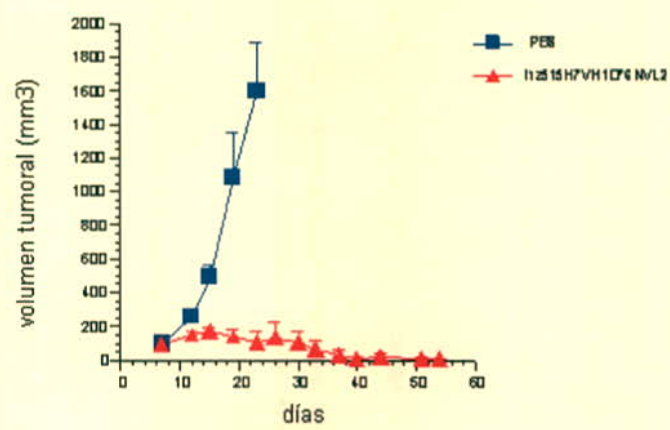


FIGURA 41

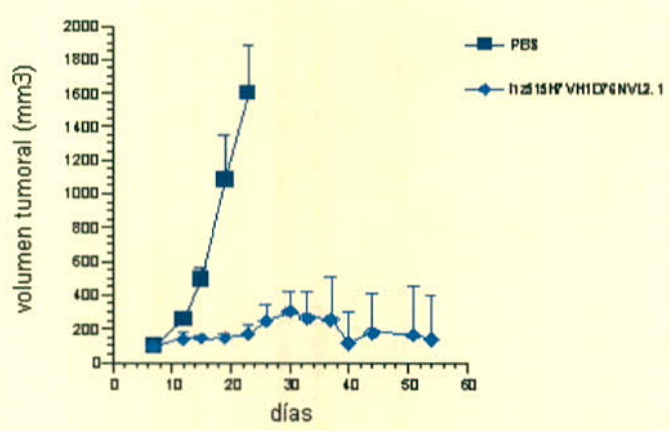


FIGURA 42

RESUMEN

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo humanizado aislado o los compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, capaces de unirse con CXCR4, pero también de inducir un cambio conformacional de los homodímeros y/o heterodímeros de CXCR4.

Más en particular, la presente invención se refiere a anticuerpos hz515H7, específicos de la proteína CXCR4, así como a su uso para el tratamiento de cáncer. Las composiciones farmacéuticas compuestas por tales anticuerpos y un proceso para la selección de tales anticuerpos también se hallan cubiertos.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Warcoin, Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
75847 Paris Cedex 17
FRANCE

NIB

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

09.07.2012

Applicant's or agent's file reference
357699 D28523

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2011/054945

International filing date (day/month/year)
30.03.2011

Priority date (day/month/year)
30.03.2010

Applicant
PIERRE FABRE MEDICAMENT

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Leineweber, K

Tel. +31 70 340-4737



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 357699 D28523	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/EP2011/054945	International filing date (day/month/year) 30.03.2011	Priority date (day/month/year) 30.03.2010
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/28		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>8</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☒ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand	Date of completion of this report	
09.09.2011	09.07.2012	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized officer Le Flao, Katell Telephone No. +31 70 340-1040 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2011/054945

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-109 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-96 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 filed with the letter of 13-06-2012

Drawings, Sheets

1/35-35/35 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 20-26
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2011/054945

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. II Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)).
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:
- see separate sheet

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):
- see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2011/054945

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re Item II

The priority claiming is not an issue. Claimed subject-matter is either duly entitled to have the priority date as effective filing date or relates to embodiment disclosed for the first time in the application as filed, thereby not being anticipated by intermediate disclosure.

Re Item V

1 Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure.

D1 TANAKA R ET AL: "Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 23, December 2001, pages 11534-11543, XP002548956

D2 DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 1 February 2009, DING YIN-LU ET AL: "[Effect of stromal cell-derived factor-1 and its receptor CXCR4 on liver metastasis of human colon cancer]" XP002597109

2 Claims 1-19 are novel due to the structural characterisation and involve an inventive step (Article 33(2) and 33 (3) PCT).

2.1 Document D2, considered as the closest prior art for claim 1, discloses that anti-CXCR4 monoclonal antibody could inhibit both functions of SDF-1 on HT-29 cells, the proliferation and migration of the HT-29 cells. It was concluded that "SDF-1/CXCR4 biological axis play an important role in liver metastasis of human colon cancer. Arrest of CXCR4 can inhibit liver metastasis of colon cancer through blocking cell proliferation and migration induced by SDF-1" (see the abstract).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2011/054945

- 2.2 Claim 1 differs in that it relates to a humanized anti CXCR4 antibody defined by six CDRs. Antibodies having these six CDRs were shown to have particular effects which are (i) inducing conformational changes on CXCR4 dimers and on CXCR4/CXCR2 heterodimers, (ii) inhibiting signaling induced by SDF-1 (see examples).
- 2.3 The technical problem, which is to provide improved anti CXCR4 monoclonal antibodies neutralizing cancer cell proliferation or migration, is therefore solved by claim 1. Since the claimed humanized antibody is not only retaining certain effects known for monoclonal antibodies but is associated with other particular effect, it is considered as involving an inventive step. The same applies to claims 2-19.

Re Item VI

The following documents were not cited in the international search report. A copy of the documents is appended hereto.

The documents EP2246364 (WO2010125162) and EP2172485 (WO2010037831) do not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b) PCT and do not disclose all the claimed features. Therefore they will not be considered as part of the prior art according to Art. 54(3) EPC in the regional phase before the EPO.

Jacques WARCOIN
Francis AHNER
Christlan TEXIER
Eric LE FORESTIER
Jean-Robert CALLON DE LAMARCK
Marc LEVIEILS
Jérôme COLLIN
Franck TETAZ
Evelyne ROUX
Frédérique FAIVRE PETIT

CABINET REGIMBEAU

Propriété Intellectuelle

European Patent and Trademark Attorneys
Conseils en Propriété Industrielle

PARIS
Isabelle THILL
Martine BLOCH-WEILL
Marie AUDREN
Thomas MOISAND
Barbara CASADEWALL
Anne BOUTARIC
Stéphane CELAIRE
Axelle TRICHARD
Emmanuelle LEVY
Julie BRUN
Cécile PUECH
Anne-Laure DELEUZE
Soizic GUINDEUIL
Oung-Heng HENG
Nicolas DEMILLY
Malaurie PANDALACCI
Esther DUPAIN
Gabrielle FAURE ANDRÉ
Sarah GORINTIN
Katia POUILLY-RIOU
Carole AJADJ
Vincent GILBEY
Jean-David COHEN KHALLAS
Anne SEIBEL
Nicolas BOUQUIN
Stéphanie BELBEOCH
Mathieu ORJOIS
Chloé BRAYNE
Jean-Charles NICOLLET
James LAWRENCE
Emmanuelle GROT
Charlotte LEBU
Damien MACE
Julie TOUG

LYON
Franck TETAZ
Olivier PRATS
Isabelle PINAUD
Jean-Jacques BOUILLET
Luella VERNOUX
Sylvain THIVILLIER
Katherine HINTERBERG
Pierre BOUGEARD

RENNES
Jean-Yves BRANGER

Françoise BOMER
Eric ROUSSEL
Caroline HUGUET

MONTPELLIER
Michel PERNELLE

GRENOBLE
Frédérique DURIEUX RIVAS

VEILLE ET DOCUMENTATION
Isabelle MARY CLÉRY
Emilie GROVER
Xavier MORIN
Aurélie MATHIEU

PARIS - SIÈGE SOCIAL
20, rue de Chazelles,
75847 Paris Cedex 17 - France
Tél. : + 33 (0) 1 44 29 35 00
Fax : + 33 (0) 1 44 29 35 99
E-mail : paris@regimbeau.eu
www.regimbeau.eu

LYON
139, rue Vendôme
69477 Lyon Cedex 06
Tél. : + 33 (0) 4 72 83 85 70
Fax : + 33 (0) 4 78 24 30 78
E-mail : lyon@regimbeau.eu

RENNES - Saint-Grégoire
Espace performance - Bât. K
35769 St-Grégoire Cedex
Tél. : + 33 (0) 2 23 25 26 50
Fax : + 33 (0) 2 23 25 26 59
E-mail : rennes@regimbeau.eu

MONTPELLIER
La Coupole Sud - 329, rue Léon Blum
34000 Montpellier
Tél. : + 33 (0) 4 99 53 21 70
Fax : + 33 (0) 4 99 53 21 75
E-mail : montpellier@regimbeau.eu

GRENOBLE
La Petite Halle - 31, rue Gustave Eiffel
38000 Grenoble
Tél. : + 33 (0) 4 38 12 24 15
Fax : + 33 (0) 4 76 21 59 87
E-mail : grenoble@regimbeau.eu

MUNICH - Allengue
Eduard-Schmid-Strasse 2
81541 Munich
Tél. : + 49 89 6242980
E-mail : munich@regimbeau.eu

DAVDV4

Cabinet REGIMBEAU - WARCOIN, AHNER, TEXIER, LE FORESTIER, CALLON, LEVIEILS, COLLIN, TETAZ, ROUX, FAIVRE PETIT
Société Civile au capital de 30 489,80 euros - R.C.S. PARIS D 784 661 357 - N° T.V.A. Intracommunautaire FR 14 784 661 357
Membre d'une association agréée. Le règlement par chèque est accepté.

03/12

EUROPEAN PATENT OFFICE
P.B. 5818
Patentlaan 2
NL - 2280 HV RIJSWIJK
THE NETHERLANDS
Attention to Mrs Le Flao

Telecopy:

00 31 70 340 3016

+ confirmation

Fedex n°7979 0286 3852

Paris, June 13, 2012

PCT application N° EP2011/054945 of March 30, 2011

In the name of : PIERRE FABRE MEDICAMENT

Title : NOVEL HUMANIZED ANTI CXCR4 ANTIBODIES FOR THE
TREATMENT OF CANCER

Our ref. : 357699 D28523 - NIB/cb

Dear Sirs,

This is further to the notification issued on June 13, 2012 with respect to the above-referred international application.

In order to better define the invention, enclosed please find a new set of claims. Former claims 2 to 5 have been deleted and all the other claims renumbered accordingly.

We submit that the remaining claims do not go beyond the disclosure of the international application as filed. In addition, it was acknowledged in the said notification that the remaining claims involve an inventive step.

Issuance of a positive IPER is thus expected.

Yours sincerely,

Nicolas BOUQUIN

Frédérique FAIVRE PETIT

Enc : amended set of claims

CLAIMS

1. A humanized antibody capable of binding specifically to CXCR4, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that the said humanized
5 antibody, or derived compound or functional fragment of same, comprises heavy and light chains, said heavy chain having CDRs consisting of CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3, and the said light chain having CDRs consisting of CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3, wherein said CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 comprise respectively the sequences SEQ ID Nos. 4, 5 and 6, and said CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 comprise respectively the sequences
10 SEQ ID Nos. 7, 8 and 9.

2. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to claim 1, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 10, 11, 12, 13, 83, 85 or 87 and a light chain variable region of sequence selected from the group consisting of SEQ ID
15 Nos. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 84, 86 or 88.

3. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to claim 1, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 21, 22, 23, 24, 89 or 91 and a light chain of sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 90
20 or 92.

4. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to claim 1, selected from the group consisting of:
- humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No.
25 11, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 16;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 22, and a light chain of sequence SEQ ID No. 27;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same,
30 characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 11, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 17;

- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 22, and a light chain of sequence SEQ ID No. 28;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 11, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 18;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 22, and a light chain of sequence SEQ ID No. 29;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 11, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 19;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 22, and a light chain of sequence SEQ ID No. 30;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 12, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 14;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 23, and a light chain of sequence SEQ ID No. 25;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 12, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 15;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 23, and a light chain of sequence SEQ ID No. 26;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 10, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 14;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 21, and a light chain of sequence SEQ ID No. 25;

- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 10, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 88;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 21, and a light chain of sequence SEQ ID No. 92;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 11, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 88;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 22, and a light chain of sequence SEQ ID No. 92;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 12, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 88;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 23, and a light chain of sequence SEQ ID No. 92;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 13, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 88;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 24, and a light chain of sequence SEQ ID No. 92;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 14;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 25;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 15;

- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 26;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 16;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 27;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 17;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 28;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 18;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 29;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 19;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 30;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain variable region of sequence SEQ ID No. 87, and a light chain variable region of sequence SEQ ID No. 20;
- a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that it comprises a heavy chain of sequence SEQ ID No. 91, and a light chain of sequence SEQ ID No. 31.

5. An isolated nucleic acid molecule characterized in that it is selected among the following nucleic acids:

- a) a nucleic acid, DNA or RNA, coding for a humanized antibody, or for a derived compound or functional fragment of same, according to one of the claims 1 to 4;
- 5 b) a nucleic acid complementary to a nucleic acid as defined in a);
- c) a nucleic acid of at least 18 nucleotides capable of hybridizing under highly stringent conditions with at least one of the 3 CDRs of a heavy chain comprising the nucleic acid sequences SEQ ID Nos. 38 to 41, 49 to 52, 93 or 95; and
- 10 d) a nucleic acid of at least 18 nucleotides capable of hybridizing under highly stringent conditions with at least one of the 3 CDRs of a light chain comprising the nucleic acid sequences SEQ ID Nos. 42 to 48, 53 to 59, 94 or 96.

6. An isolated nucleic acid molecule according to claim 5 comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of:

- a nucleic acid sequence encoding a heavy chain variable region of a humanized antibody, said heavy chain variable region nucleotide sequence comprising a CDR-H1 nucleotide sequence of SEQ ID No. 32, a CDR-H2 nucleotide sequence of SEQ ID No. 33 and a CDR-H3 nucleotide sequence of SEQ ID No. 34;
- 15 - a nucleic acid sequence encoding a light chain variable region of a humanized antibody, said light chain variable region nucleotide sequence comprising a CDR-L1 nucleotide sequence of SEQ ID No. 35 or 60, a CDR-L2 nucleotide sequence of SEQ ID No. 36 or 61, and a CDR-L3 nucleotide sequence of SEQ ID No. 37 or 62; and
- 20 - a nucleic acid sequence encoding a nucleic acid sequence encoding a heavy chain variable region and a light chain variable region of a humanized antibody,

- i) said heavy chain variable region nucleotide sequence comprising a CDR-H1 nucleotide sequence of SEQ ID No. 32, a CDR-H2 nucleotide sequence of SEQ ID No. 33 and a CDR-H3 nucleotide sequence of SEQ ID No. 34; and
- 25 ii) said light chain variable region nucleotide sequence comprising a CDR-L1 nucleotide sequence of SEQ ID No. 35 or 60, a CDR-L2 nucleotide sequence of SEQ ID No. 36 or 61, and a CDR-L3 nucleotide sequence of SEQ ID No. 37 or 62.

30 7. A vector composed of a nucleic acid according to any of the claims 5 and 6.

8. A host cell comprising a vector according to claim 7.

9. A transgenic animal, except for man, comprising a cell transformed by a vector according to claim 8.

10. A method for producing a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, characterized in that said method comprises the following steps:

- the culture in a medium of and the suitable culture conditions for a host cell
5 according to claim 8; and
- the recovery of said antibody, or one of its functional fragments, thus produced from the culture medium or from said cultured cells.

11. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to one of the claims 1 to 4, for use as a drug.

- 10 12. A composition comprising as an active ingredient a compound consisting of a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to one of the claims 1 to 4 and 11.

13. A composition according to claim 12, characterized in that it comprises, in addition, as a combination product for use in a simultaneous, separated or extended
15 fashion, an anti-tumor antibody other than an antibody directed against CXCR4.

14. A composition according to one of the claims 12 or 13, characterized in that it comprises, in addition, as a combination or conjugation product for use in a simultaneous, separated or extended fashion, a cytotoxic/cytostatic agent, a cellular toxin and/or a radioisotope.

- 20 15. A composition according to one of the claims 12 to 13, for use as a drug.

16. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to any of the claims 1 to 4 or 11, and/or of a composition according to any of the claims 16 to 18, for the prevention or treatment of cancer.

- 25 17. A humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, and/or a composition according to claim 16, characterized in that said cancer is a cancer selected among prostate cancer, osteosarcoma, lung cancer, breast cancer, endometrial cancer, multiple myeloma, ovarian cancer, pancreatic cancer and colon cancer.

18. A process of detecting in vitro the presence and/or the location of a CXCR4 expressing tumor in a subject, wherein said process comprises the steps of:

- 30 (a) contacting a sample from the subject with a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to one of the claims 1 to 4 or 11; and
- (b) detecting the binding of said antibody with the sample.

297
282

116

19. A kit comprising at least a humanized antibody, or a derived compound or functional fragment of same, according to one of the claims 1 to 4 or 11, said antibody being preferably labeled.

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

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

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

A este efecto, lo(s) 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 desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

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

Otorgado y firmado en
Hoy.....de.....de...200.....

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

POWER OF ATTORNEY

The Undersigned.....**Jean-Pierre COUZINIER**.....
Acting as **Chief Operating Officer**.....
Of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**.....
Company incorporated as per the laws of **France**.....

domiciled in **45, Place Abel Gance**.....
With principal offices in **Castres**.....

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

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

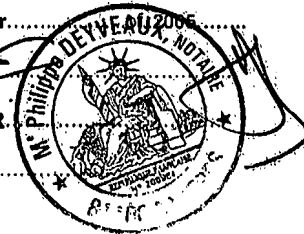
This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN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

Granted and signed in **Castres**

This 3rd day of...November.....

Signature.....
Name **Jean-Pierre COUZINIER**

Title **Chief Operating Officer**



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy.....de.....de.....
personalmente compareció ante mí.....

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él/ella es.....

de.....

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las rubeas de la existencia de la sociedad.

Estado de.....

con fecha.....

y que quien confiere el presente poder es su representante.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 3rd day of November.....of 2005.....

personally appeared before me Jean-Pierre COUZINIER

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the **Chief Operating Officer**.

of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**...

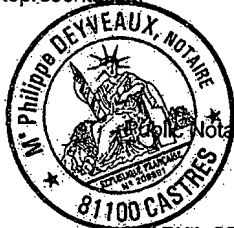
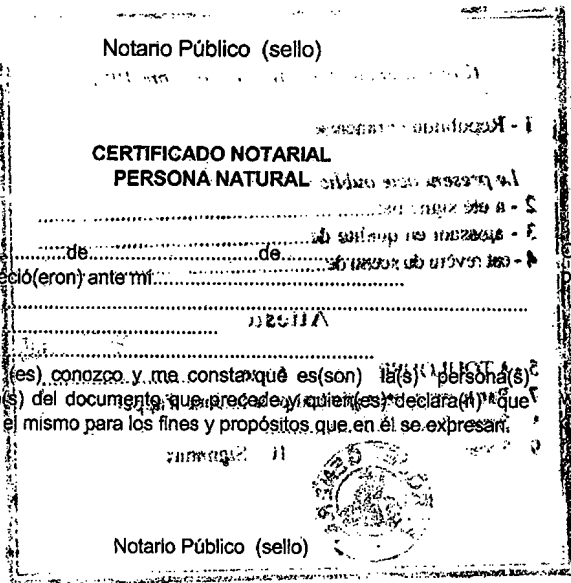
Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company..

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of **France**....

under date of **November 3rd, 2005**.....

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.



**NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON**

On this.....day of.....of.....
personally appeared before me.....

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par Philippe DEXEAD

3 - agissant en qualité de Notaire

4 - est revêtu du sceau de Castres

Atteste 14 NOV. 2005

5 - à TOULOUSE 6 - le

7 - Par le procureur général près la cour d'appel

8 - Sous n° 2862

9 - Sceau 10 - Signature



**TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por PIERRE
FABRE MÉDICAMENT, domiciliada en 45, Place Abel Gance.**

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Republica Francesa

Este documento público

2. ha sido firmado por el Sr. Philippe DÉYVEAUX

3. actuando en capacidad de Notario

4. lleva el sello de la oficina de CASTRES

Certificado

5. en TOLOUSE

6. el 14 de noviembre de 2005

7. por el Procurador general para la Corte de apelaciones

8. No. 7842

9. Sello

10. Firma

(Firma)

300
285

122681

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 112102
		Bogotá D.C., Octubre 25 de 2012 - 18:02:14

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	495378973	25/10/2012	24.401.200.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

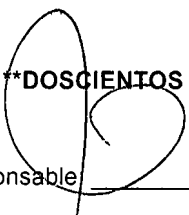
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-195608- -00000-0000
Fecha: 2012-10-30 17:07:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286

304
286

122681

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0047119	
				Bogotá D.C., Mayo 14 de 2012 - 08:26:22	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	445891563	11/05/2012	10.090.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	270.000.00	270.000.00	
				\$270.000.00	
=====					
SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-195608- -00000-0000 Fecha: 2012-10-30 17:07:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 286					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Plsos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Mayo 14 de 2012 - 08:26:26					



No. 12-195608- -00000-0000

Fecha: 2012-10-30 17:07:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 286LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONESDE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 ☐