



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-037770-A-00000-0000

Fecha: 2013-03-08 13:53:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

21. EXPEDIENTE No.

10-37770-A

54. TÍTULO

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFI - AVENTIS

DOMICILIO

PARIS, FRANCIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-037770-A-00000-0000

Fecha: 2010-04-05 17:19:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 309**FORMULARIO UNICO DE SC
PCT
ENTRADA EN FAS
SOLICITUD**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-037770-A-00000-0000

Fecha: 2013-03-08 13:53:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

1

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

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **SANOFI-AVENTIS**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.Dirección: 174 Avenue de France,
75013 Paris,
FranciaDomicilio: Paris,
Francia**IDENTIFICACIÓN**

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Renata LEE**8 Lucinda Court,
Edison,
New Jersey 08820,
Estados Unidos de América3. **Elizabeth ALLEN**1103 Monroe Drive,
Stewartville,
New Jersey 08886,
Estados Unidos de América5. **Beatrice CAMERON**11 bis Rue Vauquelin,
75005 Paris,
Francia7. **Nicolas BAURIN**35 Rue De La Bretoniere,
91180 St. Germain Les Arpajon,
Francia2. **Vincent MIKOL**48 Rue Gabrielle,
94220 Charenton-le-Pont,
Francia4. **Norman RUETSCH**35 Apple Orchard Road,
Moorestown,
New Jersey 08057,
Estados Unidos de América6. **Thomas OLIGINO**2422 Fringe Lane,
Forks Township,
Pennsylvania 18040,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2008/074381Fecha: 27 de agosto de 2008Publicación Internacional No. WO 2009/032661 A1Fecha: 12 de marzo de 2009

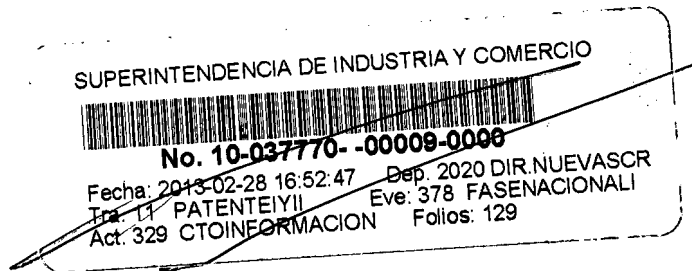
6

Título (54)**ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS, DERIVADOS DE LOS MISMOS Y SU
USO**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 039/395

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.



Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 329

Referencia Expediente No. 10037770
Asunto Solicitud de patente para
**ANTICUERPOS ANTI-CXCR5 HUMANIZADOS Y DERIVADOS DE
LOS MISMOS**
Solicitante **SANOFI-AVENTIS**
Fecha de solicitud 5 de abril de 2010

1. Yo, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me permito presentar una solicitud divisional del asunto en referencia.
2. La Decisión 486 en su artículo 36 establece que: "El solicitante podrá, en cualquier momento del trámite, dividir su solicitud en dos o más fraccionarias, pero ninguna de éstas podrá implicar una ampliación de la protección que corresponda a la divulgación contenida en la solicitud inicial".
3. De acuerdo a lo anterior, solicito gentilmente se acepte esta solicitud divisional teniendo en cuenta que me encuentro dentro del tiempo indicado en la legislación vigente y que la materia a proteger se encuentra totalmente contenida en la solicitud inicial. En consecuencia, se cumplen todos los requisitos para que sea aceptada esta modificación.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

4. **ANEXOS**

- Capítulo descriptivo correspondiente a la solicitud original
- Pliego reivindicatorio correspondiente a la solicitud divisional conformado por 11 reivindicaciones
- Comprobante de pago por una reivindicación adicional después de la décima por valor de \$ 30 000
- Poderes correspondientes
- Comprobante de tasa por solicitud por valor de \$450 000

Señor Director,

Luiz Clemencia de Páez

LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-14775-0841-120-0
COLO-14775-0841-179-6
RBL\RBLID-236869\WPC14775
No. M-2013-236869\RBL



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión
- ☒ División
- ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

SANOFI-AVENTIS

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Francia	174 Avenue de France,	75013 Paris
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4
5

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente : 10.037.770 De: _____ A: _____	Expediente _____ _____ De: _____ A: _____

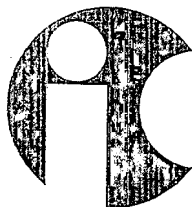
5.	Comprobante de Pago No 13-0014242 Comprobante de Pago No 13-0019158	Fecha : 2013/02/13 Fecha : 2013/02/27
----	--	--

6.	Anexos
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000
☒	Comprobante de pago por 1 reivindicación adicional después de la décima reivindicación por \$ 30.000
☒	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☒	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☐	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	<i>Luz Clemencia de Paez</i>
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 10.037.770. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 5 de abril de 2010 y la prioridad que allí se reivindica el 29 de agosto de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 10.037.770.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

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

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SANOFI-AVENTIS

DOMICILIO PARIS, FRANCIA

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

22. BOGOTÁ, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión
- ☒ División
- ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

SANOFI-AVENTIS

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Francia	174 Avenue de France,	75013 Paris
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica		No. Fax
cavelier@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

79

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente : **10.037.770**
De: _____
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

5. Comprobante de Pago No 13-0014242 Fecha : 2013/02/13
Comprobante de Pago No 13-0019158 Fecha : 2013/02/27

6. Anexos

☒

 Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000

☒

 Comprobante de pago por 1 reivindicación adicional después de la décima reivindicación por \$ 30.000

☒

 Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☒

 Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐

 Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre,y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	<i>Luz Clemencia De Paez</i>
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 10.037.770. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 5 de abril de 2010 y la prioridad que allí se reivindica el 29 de agosto de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 10.037.770.

9/11

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

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES

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

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

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

1
2
3

RESUMEN

[0005] La presente invención proporciona nuevos anticuerpos humanizados y humanos y fragmentos y derivados de los mismos, que se unen específicamente al CXCR5. Algunos de los anticuerpos y fragmentos de unión al CXCR5 de los mismos se pueden alterar para evitar la formación de enlaces disulfuro intracatenarios dando como resultado una molécula que es estable a lo largo de la preparación y uso *in vivo*. Otros anticuerpos de interés pueden alterarse para minimizar la unión al FcR. Algunos anticuerpos CXCR5 de interés compiten con CXCL13 por la unión al CXCR5. Otros anticuerpos reducen la actividad de CXCR5.

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

X
13

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

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

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

[0017] El CXCR5 es un receptor no promiscuo. El CXCL13 es un ligando de CXCR5 y se expresa constitutivamente en células estromáticas tales como células dendríticas foliculares y en tejidos linfoides. El CXCL13 atrae específicamente a las células B y a un pequeño subconjunto de células T denominadas células T foliculares auxiliares de B, TFH. Que no puede ser inesperado dada la mayoría de las interacciones entre las poblaciones de células B y células T en el sistema inmunológico. Más aún, las células T activadas inducen o regulan en por aumento la expresión del CXCR5. Se ha descubierto que la infiltración de linfocitos en centros germinales (GC) ectópicos terciarios se correlaciona bien con una mayor gravedad de la enfermedad y pérdida de tolerancia en ciertos trastornos que se preajustan con tales estructuras parecidas a ganglios linfáticos atípicos. utilizando modelos de murinos *in vivo*, tales como ratones CXCR5^{-/-} y CXCL13^{-/-}, la ausencia del receptor o el ligando produce una arquitectura fina de GC alterada debido a una localización alterada de células T y B, y posiblemente interacción. Estos ratones también están protegidos frente al desarrollo de una artritis inducida por colágeno (CIA) severa. Como el CXCR5 se expresa selectivamente en células B maduras, que están asociadas con la patogenia de RA, el bloqueo de este receptor modulará la respuesta artritogénica en individuos afectados. El tratamiento de la artritis reumatoide con agentes biológicos (es decir, anticuerpos anti-TNF α y anti-CD20, Rituximab) ha resultado ser clínicamente eficaz; en particular, pacientes sometidos a una terapia dirigida a las células B han demostrado mejorías de larga duración en síntomas y signos clínicos. La fijación selectiva del CXCR5 como objetivo, que sólo se expresa en células B maduras y en células T auxiliares de B, no afectará al desarrollo de las células B ni inmunocomprometerá al paciente. A diferencia de Rituximab, el anticuerpo de la presente memoria es un anticuerpo neutralizador que no media la citotoxicidad celular.

12
(4)

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

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

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

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

[0022] Las frases y términos "fragmento funcional, variante, derivado o análogo" y similares, así como formas de las mismas, de un anticuerpo o antígeno se refieren a un compuesto o molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa o antígeno de interés. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-CXCR5 es uno que puede unirse a una molécula de CXCR5 o uno que puede impedir o reducir sustancialmente la capacidad de un ligando, tal como CXCL13, o de un anticuerpo agonista o antagonista, de unirse al CXCR5. Un ejemplo es una molécula de scFv. En cuanto a una variante del CXCR5 o derivado del mismo, es una molécula que no es idéntica a un CXCR5 natural pero que puede utilizarse para un fin de la presente invención aunque no sea idéntica al CXCR5 de tipo silvestre, no obstante, se puede utilizar como un inmunógeno para inducir anticuerpos que se unen selectivamente al CXCR5 de tipo silvestre.

[0023] Son variantes de "sustitución" aquellas en las que por lo menos un residuo aminoácido de una secuencia natural se ha retirado y se ha reemplazado por un aminoácido diferente insertado en su sitio en la misma posición. Las sustituciones pueden ser individuales, cuando sólo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, cuando se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las sustituciones plurales pueden estar en

sitios consecutivos. Además, un aminoácido puede reemplazarse por múltiples residuos, en cuyo caso dicha variante comprende tanto una sustitución como una inserción. Son variantes de "inserción" aquellas en las que se han insertado uno o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en una secuencia natural. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado al grupo funcional α -carboxilo o α -amino del aminoácido. Son variantes de "eliminación" aquellas en las que se han eliminado uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos natural. Normalmente, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

[0024] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo o polipéptidos sintéticos que llevan una o más secuencias CDR o derivadas de CDR siempre que los polipéptidos presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Generalmente, los anticuerpos se consideran Ig con una especificidad definida o reconocida. De esta manera, aunque los anticuerpos presentan especificidad de unión a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas parecidas a anticuerpos que carecen de especificidad por una diana. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y así sucesivamente), o subclase (por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂ y así sucesivamente) ("tipo" y "clase", y "subtipo" y "subclase", se usan indistintamente aquí). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas naturales o de tipo silvestre, es decir, obtenidas a partir de un miembro de una población no manipulado artificialmente, normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo. Por "no manipulado artificialmente" se entiende no tratado para que contenga o exprese una molécula de unión a antígenos externos. Tipo silvestre se refiere a la especie o alelo más prevalente encontrado en una población o al anticuerpo obtenido a partir de un animal no manipulado, en comparación con un alelo o polimorfismo, o una variante o derivado obtenido por una forma de manipulación, tal como mutagenia, uso de métodos recombinantes y similares, para cambiar un aminoácido de la molécula de unión a antígenos.

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

[0026] El término "variable", en el contexto de un dominio variable de anticuerpos, se refiere a ciertas partes de la molécula pertinente que difieren considerablemente en la secuencia entre y con los anticuerpos y se usan en el reconocimiento y unión específica de un anticuerpo

particular para su diana particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. La variabilidad se concentra en tres segmentos denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) también conocidas como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan secuencias o regiones de estructura (FR). Los dominios variables de cada cadena pesada y ligera natural comprende cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres CDR, que forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas a menudo próximas por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana (epítipo o determinante) de anticuerpos (véase Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Como se utiliza aquí, la numeración de los residuos aminoacídicos de una inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos aminoacídicos de inmunoglobulinas de Kabat et al., a menos que se indique otra cosa. Una CDR puede tener la capacidad de unirse específicamente al epítipo afín.

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

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

[0029] El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígenos, cuyos fragmentos pueden comprender un dominio variable de cadena pesada

17/1/80

(V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Por medio del uso de un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios variables de la misma cadena, los dominios del diacuerpo se ven forzados a emparejarse con los dominios de unión de otra cadena para crear dos sitios de unión a antígenos.

[0030] El fragmento F_{ab} contiene los dominios variables y constantes de la cadena ligera y el dominio variable y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos F_{ab'} difieren de los fragmentos F_{ab} por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxilo del dominio C_{H1} para incluir una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F_{ab'} pueden producirse por división del enlace disulfuro en las cisteínas de bisagra del producto de digestión con pepsina de F_{(ab')₂}. Otros tratamientos enzimáticos y químicos adicionales de anticuerpos pueden producir otros fragmentos funcionales de interés.

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

[0032] Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular (tipo o subtipo), siendo el resto de la cadena o cadenas idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada de unión al CXCR5 o de afectar a la actividad o al metabolismo del CXCR5 (Patente de Estados Unidos n° 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). De esta manera, las CDR de una clase de anticuerpo pueden injertarse en la FR de un anticuerpo de una clase o subclase diferente.

[0033] Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un solo sitio objetivo, epítipo o determinante. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos) de un antígeno, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales se sintetizan ventajosamente por una célula anfitriona, sin contaminar por otras inmunoglobulinas, lo cual permite la clonación del gen relevante y el ARNm que codifica el anticuerpo o sus cadenas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso con la presente invención se pueden aislar a partir de colecciones de anticuerpos en fagos utilizando técnicas bien conocidas o pueden purificarse a partir de una preparación policlonal. Los anticuerpos monoclonales progenitores a usar de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse por el método de hibridoma descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o pueden obtenerse por

46
102

métodos recombinantes bien conocidos en la técnica.

[0034] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como F_v , F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab')_2}$ u otras subsecuencias de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de plantilla de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (F_c), típicamente la de la plantilla de inmunoglobulina humana elegida. En general, el objetivo es disponer de una molécula de anticuerpo que sea mínimamente inmunogénica en un ser humano. De esta manera, es posible que uno o más aminoácidos de una o más CDR también puedan cambiarse por uno que sea menos inmunogénico para un anfitrión humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de dichas una o más CDR al CXCR5 o a CXCL13. Como alternativa, la FR puede ser no humana, pero los aminoácidos más inmunogénicos se reemplazan por otros menos inmunogénicos. Sin embargo, el injerto de CDR, como se ha descrito anteriormente, no es la única manera de obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, es posible que no sea suficiente la modificación únicamente de las regiones CDR ya que es bastante común que los residuos de estructura tengan una función en la determinación de la estructura tridimensional de los bucles de CDR y la afinidad global del anticuerpo por su ligando. Por lo tanto, puede ponerse en práctica cualquier medio de manera que la molécula de anticuerpo progenitor no humano se modifique para que sea una menos inmunogénica para un ser humano, y no siempre es necesaria la identidad global de la secuencia con un anticuerpo humano. De esta manera, la humanización también puede conseguirse, por ejemplo, por la sola sustitución de unos pocos residuos, particularmente los que están expuestos en la molécula de anticuerpo y no ocultos dentro de la molécula y por lo tanto, no fácilmente accesibles para el sistema inmune del anfitrión. Dicho método se enseña aquí con respecto a la sustitución de residuos "móviles" o "flexibles" en la molécula de anticuerpo, siendo el objetivo reducir o mitigar la inmunogenicidad de la molécula resultante sin comprometer la especificidad del anticuerpo por su epítipo o determinante. Ver, por ejemplo, Studnicka et al., Prot Eng 7(6)805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), documento WO 2006/042333 y la Patente de Estados Unidos N° 5.869.619.

[0035] La respuesta inmune adaptativa tiene dos brazos principales: la respuesta inmune celular de los linfocitos T y la respuesta inmune humoral de linfocitos B secretores de anticuerpos. Los epítipos de células B pueden ser aminoácidos contiguos, lineales, o pueden ser conformacionales (Protein Science (2005) 14, 246). Por el contrario, los epítipos de células T son péptidos lineales cortos que se dividen de proteínas antigénicas que se presentan en el contexto de proteínas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC), o, en el caso de seres humanos,

moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I o de clase II. La presentación de epítipo depende tanto de la unión al péptido MHC como de las interacciones con el receptor de las células T (TCR). Las proteínas del MHC son altamente polimórficas y cada una se une a una serie limitada de péptidos. De esta manera, la combinación particular de alelos del MHC presentes en un anfitrión limita el intervalo de posibles epítopos reconocidos durante una infección.

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

[0037] Un método de humanización de interés se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmune. La flexibilidad de una proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de una proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o un solo residuo aminoacídico para adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. La información sobre la flexibilidad de la proteína puede obtenerse realizando experimentos de cristalografía de rayos X (ver, por ejemplo, Kundu et al. 2002, Biophys J 83:723–732.), experimentos de resonancia magnética nuclear (ver, por ejemplo, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) o realizando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación MD de una proteína se realiza en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína durante un periodo calculando las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el periodo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de proteínas, denominadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el periodo de la simulación, por ejemplo, cada 1 picosegundo (ps). Por medio del análisis del conjunto de instantáneas se puede cuantificar la flexibilidad de los residuos aminoacídicos de la proteína. De esta manera, un residuo flexible es uno que adopta un conjunto de diferentes conformaciones en el contexto del polipéptido dentro del cual reside dicho residuo. Los métodos de MD son conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, Nueva York, 1988). Varios programas de software permiten simulaciones de MD, tales como Amber (véase Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (véase Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; y MacKerell et al. (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase

76
20

Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

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

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

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

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

[0042] Así, se conduce una comparación de la trayectoria dinámica molecular del anticuerpo de interés con las trayectorias de una colección de estructuras de anticuerpo de línea germinal. Se compara el 16D7 con una colección de estructuras de anticuerpo de línea germinal. La

trayectoria dinámica molecular retenida de cada anticuerpo es un conjunto de cálculos dinámicos moleculares durante la simulación de computador dinámica molecular en donde, se utilizan, por ejemplo, aproximadamente 10 conformaciones diversas como diversos puntos de partida, y para cada punto de partida se corren aproximadamente 10 simulaciones dinámicas moleculares. Se construyen 49 modelos de homología 3D de líneas germinales de anticuerpo humano al combinar sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes ($\nu\kappa 1$, $\nu\kappa 2$, $\nu\kappa 3$, $\nu\kappa 4$, $\nu\lambda 1$, $\nu\lambda 2$, $\nu\lambda 3$) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes ($\nu h 1a$, $\nu h 1b$, $\nu h 2$, $\nu h 3$, $\nu h 4$, $\nu h 5$ y $\nu h 6$) (Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593~D597). Los residuos flexibles de 16D7 se cambian luego a los residuos correspondientes de la estructura de línea germinal con una trayectoria más cercana a aquella del anticuerpo de interés.

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

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

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

[0046] Se describen estrategias y métodos para recubrir la superficie de anticuerpos, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos dentro de un anfitrión diferente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.639.641. En resumen, en un método preferido, (1) se

22

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

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

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

[0049] Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo CXCR5 de la presente invención. Preferiblemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de un anticuerpo de la presente invención. "Homología de

secuencia”, cuando se aplica a una secuencia de aminoácidos aquí, se define como una secuencia con una homología de secuencia de por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o mayor, y más preferiblemente una homología de secuencia de por lo menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con otra secuencia de aminoácidos, como se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988).

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

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

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

28
24

por ejemplo, en los documentos WO 93/21319, EPO N° de Ser. 239.400, WO 89/09622, EPO N° de Ser. 338.745 y EPO N° de Ser. 332.424.

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

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

[0055] Una vez identificado y aislado el anticuerpo, a menudo es útil generar un anticuerpo variante o mutante, o muteína, en el que se han alterado uno o más residuos aminoácidos, por ejemplo, en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, en el anticuerpo pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de residuos de estructura que producen una mejora en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo para CXCR5. Los ejemplos de residuos de región de estructura que pueden modificarse incluyen los que no se unen covalentemente al antígeno directamente (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); interaccionan con/afectan a la conformación de una CDR (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); y/o participan en la interfaz de V_L-V_H (EP 239 400). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de estos residuos de la región de estructura produce una intensificación de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno afín. Por ejemplo, en esta realización de la invención pueden alterarse de aproximadamente uno a aproximadamente cinco residuos de estructura. Algunas veces, esto puede ser suficiente para producir un anticuerpo mutante adecuado para uso en ensayos preclínicos, aunque no se haya alterado ninguno de los residuos de la región hipervariable. Sin embargo, normalmente, el mutante de anticuerpo puede comprender una o más alteraciones de la región hipervariable. Las regiones constantes también pueden alterarse para obtener propiedades efectoras deseables o más deseables.

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

[0057] Un procedimiento para obtener mutantes de anticuerpo, tales como mutantes de

25
25

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

[0058] Un método más sistemático para identificar residuos aminoacídicos a modificar comprende identificar residuos de la región hipervariable implicados en la unión al CXCR5 y los residuos de la región hipervariable con poca o ninguna implicación en la unión al CXCR5. Se realiza una exploración de alanina de los residuos de la región hipervariable que no se unen, con cada mutante de ala probado para intensificar la unión al CXCR5. En otra realización, se seleccionan los residuos implicados significativamente en la unión al CXCR5 para ser modificados. La modificación puede implicar la eliminación de un residuo o la inserción de uno o más residuos adyacentes a un residuo de interés. Sin embargo, normalmente, la modificación implica la sustitución del residuo por otro aminoácido. Una primera sustitución puede ser una sustitución conservadora. Si esta sustitución produce un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, en la afinidad de unión), entonces puede hacerse otra sustitución conservadora para determinar si se obtienen más cambios sustanciales.

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

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

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

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

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

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

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

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

[0067] Las sustituciones no conservadoras pueden suponer el intercambio de un

aminoácido por un aminoácido de otro grupo. Las sustituciones conservadoras pueden implicar el cambio de un aminoácido por otro dentro de un grupo.

[0068] Las sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de estos análogos. Los análogos pueden incluir varias mutéínas de una secuencia distinta de la secuencia del péptido de ocurrencia natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples (preferiblemente sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia de ocurrencia natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio que forma los contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia progenitoras, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia progenitora) a menos que haya un cambio en el volumen o conformación del grupo R o la cadena lateral. Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

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

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

27
25

Biotechnol 9:1373 (1991)).

[0071] La exhibición de fagos monovalentes consiste en exposición una serie de variantes de proteína como fusiones de una proteína de la cubierta de bacteriófagos en partículas de fago (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). La maduración de la afinidad, o mejora de las afinidades en equilibrio de varias proteínas, se ha logrado previamente por medio de la aplicación sucesiva de mutagenia, exhibición de fagos monovalentes y análisis funcional (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); y Patente de Estados Unidos N° 5.534.617), por ejemplo, centrándose en las regiones CDR de anticuerpos (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); y Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).

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

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

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

[0075] Otro tipo de mutante de anticuerpo tiene un patrón de glicosilación alterado. Esto se puede lograr al eliminar uno o más grupos funcionales de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o al agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos típicamente está N-ligada a Asn u O-ligada a Ser o Thr. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier

aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento comunes para la adhesión enzimática de un grupo funcional de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o xilosa, por ejemplo, se unen a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original puede mejorar la probabilidad de glicosilación logada a O.

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

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

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

[0079] Se pueden derivar los residuos histidilo mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0. También se puede utilizar bromuro de p-bromofenacilo, se realiza la reacción preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6.0.

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

[0081] Se pueden modificar los residuos arginilo mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, tales como fenilglioal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y

ninhidrina. La derivación de residuos de arginina a menudo requiere condiciones de reacción alcalinas. Adicionalmente, los reactivos pueden reaccionar con lisina así como con el grupo ϵ -amino de arginina.

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

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

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

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

[0086] Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos no requieren la producción del anticuerpo en una célula anfitriona que tenga capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N- o glicosilación ligada a O-. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en la WO 87/05330 y en Aplin & Wriston, *CRC Crit Rev Biochem*, pág. 259-306 (1981).

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

28
30

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

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

[0090] El método de selección de nuevos polipéptidos de unión puede utilizar una colección de polipéptidos relacionados estructuralmente. La colección de polipéptidos relacionados estructuralmente, por ejemplo, fusionados a una proteína de la cubierta de un fago, se produce por mutagénesis, y se presenta en la superficie de la partícula. Las partículas después se ponen en contacto con una molécula diana y las partículas que tienen la mayor afinidad por la diana se separan de las de menor afinidad. Los aglutinantes de alta afinidad después se ejemplifican por infección de un anfitrión bacteriano adecuado y se repite la etapa de unión competitiva. El proceso se repite hasta que se obtienen los polipéptidos de la afinidad deseada.

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

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

[0093] Pueden producirse equivalentes funcionales intercambiando diferentes CDR de diferentes cadenas de anticuerpo dentro de una estructura o una FR compuesta derivada de una pluralidad de anticuerpos.. De esta manera, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para una serie dada de CDR por sustitución de diferentes cadenas pesadas, por ejemplo, IgG₁₋₄, IgM, IgA₁₋₂ o IgD, para producir diferentes tipos e isotipos de anticuerpo para CXCR5. De manera similar, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención se pueden producir que incluyen un conjunto de CDR dado en un marco completamente sintético.

27
21

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

[0095] En otras realizaciones, para intensificar las propiedades de una molécula de unión al CXCR5 de interés, se pueden hacer ciertas modificaciones a la parte de estructura y/o parte F_c de la molécula que lleva la porción de unión a antígeno de una molécula de interés. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos para intensificar o reducir las propiedades de interés. Así, en una molécula IgG4, las sustituciones en los sitios conocidos para impactar la función, por ejemplo, en la región de bisagra, en una región que impacta una función efectora o que impacta la unión F_c, por ejemplo, son adecuadas para modificación. En una molécula IgG4, las sustituciones, que utilizan numeración Kabat, en los aminoácidos 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255 y así sucesivamente, o combinaciones de los mismos, se pueden hacer para obtener las propiedades deseadas. Por ejemplo, sustituir una prolina por una serina 241 puede estabilizar las estructuras terciarias y cuaternarias de la moléculas (Mol Imm 30(1)105-108, .1993), y sustituir el ácido glutámico por leucina 248 puede amortiguar las funciones efectoras O hnm 164(4)1925-1033, 2000; y Oin Innn 98(2) 164-174, 2001).

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

[0097] Por lo tanto, por ejemplo, se trata el 16D7-HCI-LC3 para contener dos sustituciones, S241P y L248E. Los residuos de ácido glutámico y prolina confieren propiedades deseadas sobre una molécula de unión al CXCR5 de interés que lleva una estructura IgG4, tal como, estabilidad y función efectora reducida.

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

[0099] Las CDR generalmente son importantes para el reconocimiento de epítipo y unión del anticuerpo. Sin embargo, pueden realizarse cambios a los residuos que constituyen las CDR sin interferir con la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse al epítipo afin. Por ejemplo, pueden realizarse cambios que no afectan al reconocimiento del epítipo, pero aumentan la afinidad de unión del anticuerpo por el epítipo. Varios estudios han inspeccionado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diversas posiciones en la secuencia de un anticuerpo,

basándose en el conocimiento de la secuencia primaria del anticuerpo, en sus propiedades, tales como la unión y el nivel de expresión (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; y Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

[00100] De esta manera, pueden generarse equivalentes de un anticuerpo de interés al cambiar las secuencias de los genes de cadena pesada y ligera en la CDR1, CDR2 o CDR3, o en regiones de estructura, utilizando métodos tales como mutagenia dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos, mutagenia de casetes, PCR con tendencia a error, mezcla de ADN o cepas mutadoras de *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; y Adey et al., 1996, Chap. 16, pág. 277-291, en Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Los métodos para cambiar la secuencia de ácido nucleico del anticuerpo primario pueden resultar en anticuerpos con mejor afinidad (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; y Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

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

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

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

CXCR5 en asociación con otro receptor o molécula biológica; péptidos sintéticos o de secuencia natural que se unen al CXCR5; y similares.

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

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

[00106] La "transformación" de un organismo celular, célula o estirpe celular con un ácido nucleico significa introducir un ácido nucleico en la diana de manera que el ácido nucleico se pueda replicar, como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica, y opcionalmente expresado. La "transfección" de una célula u organismo con un ácido nucleico se refiere a la captación del ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo, se exprese o no alguna secuencia codificante. Las expresiones "célula anfitriona transfectada" y "transformada" se refieren a una célula en la que se introdujo un ácido nucleico. Las células anfitrionas procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Las células anfitrionas eucariotas típicas son células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, o células de origen humano. La secuencia de ácido nucleico introducida puede proceder de la misma especie que la célula anfitriona o de una especie diferente de la célula anfitriona, o puede ser una secuencia de ácido nucleico híbrida que contiene algunos ácidos nucleicos externo y algunos ácidos nucleicos homólogos. .

[00107] El término "vector" significa una construcción de ácido nucleico, un

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

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

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

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

[00111] CXCR5 soluble o sus fragmentos, tales como el dominio extracelular (EC), pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos de interés. El inmunógeno puede obtenerse o aislarse a partir de fuentes naturales o puede obtenerse de manera recombinante. Pueden utilizarse como inmunógenos para obtener los anticuerpos de interés células enteras tales como

células CXCR5⁺, células derivadas de una fuente natural (por ejemplo, células B, estirpes celulares B o estirpes celulares cancerígenas) o células transformadas (o transfectadas) por técnicas recombinantes para expresar, y quizás sobreexpresar CXCR5, como el inmunógeno para elaborar los anticuerpos de interés. También pueden utilizarse preparaciones de membrana que llevan CXCR5 o péptidos sintéticos o polipéptidos truncados que corresponden a las regiones EC de CXCR5, como se conoce en la técnica.

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

[00113] El gen o un ADNc que codifica CXCR5, como el conocido en la técnica, puede clonarse en un plásmido o en otro vector de expresión y expresarse en cualquiera de varios sistemas de expresión de acuerdo con métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y mostrados más adelante, por ejemplo. Debido a la degeneración del código genético, una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos o la proteína CXCR5 pueden utilizarse en la práctica de expresar CXCR5 recombinante o productos funcionales del mismo. La secuencia de nucleótidos puede variar al seleccionar combinaciones basadas en posibles elecciones de codones, tales como las preferidas por la célula anfitriona. Las combinaciones se realizan de acuerdo con el código genético de tripletes estándar aplicado a la secuencia de nucleótidos que codifica CXCR5 de ocurrencia natural y pueden considerarse todas estas variaciones. Así, la secuencia codificante de CXCR5 puede registrarse de manera que contenga codones que expresan el aminoácido de interés, sin embargo, el codón de tripletes es uno favorecido por la maquinaria de expresión de genes de la célula anfitriona, tal como una célula humana. Cualquiera de estos polipéptidos puede utilizarse en la inmunización de un animal, tal como un camélido, u otro sistema para generar anticuerpos que se unan al CXCR5.

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

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

[00116] La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención, un anticuerpo monocatenario de la invención o una muteína de anticuerpo de la invención) incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo como se describe aquí. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, se puede producir el vector para la producción del anticuerpo por tecnología de ADN recombinante como se conoce en la técnica. Un vector de expresión se construye de manera que contenga secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Los métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

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

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

[00119] Además, se elige una célula anfitriona que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, división) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células

anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse estirpes celulares o sistemas anfitriones apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo expresado de interés. Por lo tanto, pueden utilizarse células anfitrionas eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Estas células anfitrionas de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, COS, 293, 3T3 o células de mieloma.

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

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

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

[00123] La célula anfitriona puede cotransfectarse con dos o más vectores de expresión de la invención, por ejemplo, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede utilizarse un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); y Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

[00124] Una vez que se ha producido una molécula de anticuerpo de la invención por un animal, se ha sintetizado químicamente o se ha expresado de manera recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por CXCR5 después de cromatografía de Proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños y así sucesivamente), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas aquí o conocidas en la técnica de otra manera, para facilitar la purificación.

[00125] La proteína CXCR5 recombinante, como se ejemplifica en los ejemplos presentados más adelante, se utiliza para inmunizar ratones para generar los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se seleccionan de los que tenían un potencial terapéutico benéfico, por ejemplo, la prevención de la unión del ligando de CXCR5. Después, los anticuerpos seleccionados se modificaron para obtener propiedades benéficas, tales como una mayor estabilidad *in vivo*.

[00126] Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales, aunque debido a la modificación de anticuerpos para optimizar el uso en seres humanos, así como para optimizar el uso del anticuerpo per se, se prefieren los anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producción y manipulación de proteínas particulares. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto (Harlow et al., Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

[00127] Por ejemplo, un inmunógeno, como se ejemplifica aquí, puede administrarse a diversos animales anfitriones que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, camélidos, ratas etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para CXCR5. La administración del inmunógeno puede incluir una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de anfitrión, y éstas incluyen, pero no se limitan a, Freund (completo e incompleto), aceite mineral, geles, alumbre (hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana (KLH), dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse por cualquier método que induzca una respuesta inmune en el anfitrión animal elegido. Así, pueden utilizarse diversas vías de administración durante diversos periodos de tiempo según la elección del diseño.

[00128] Típicamente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) se inyecta en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, o por vía intramuscular o intravenosa. El inmunógeno puede incluir un polipéptido CXCR5, una proteína de fusión o variantes de los mismos, que pueden producirse por una célula que produce o sobreproduce CXCR5, que puede ser una célula de ocurrencia natural, una célula mutante de ocurrencia natural o una célula modificada por ingeniería genética. En ciertas circunstancias, pueden utilizarse células enteras que expresan CXCR5. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, el porcentaje de hidrofobia, el porcentaje de hidrofilia, la estabilidad, la carga neta, el punto isoeléctrico etc.), el CXCR5 o la porción del mismo puede modificarse o conjugarse para que sea inmunogénico o más inmunogénico en el animal, tal como un mamífero a inmunizar. Por ejemplo, CXCR5 o una parte del mismo puede conjugarse con un vehículo. La conjugación incluye conjugación química por derivación de grupos químicos funcionales activos de manera que tanto el inmunógeno como la proteína inmunogénica se conjuguen de manera que se forme un enlace covalente, o por medio de una metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por el experto. Los ejemplos de estos vehículos o proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, KLH, ovalbúmina, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos auxiliares T promiscuos. Para aumentar la respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente pueden utilizarse varios adyuvantes.

[00129] Una vez obtenida una preparación adecuada, es posible aislar anticuerpos particulares de los anticuerpos plurales por técnicas de separación conocidas, tales como cromatografía de afinidad, "panning", absorción y así sucesivamente. De esta manera, puede obtenerse una especie de anticuerpo individual para un estudio adicional, por ejemplo, por secuenciación para obtener las secuencias de aminoácidos de una o más CDR.

[00130] Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente comprenden

40
30

anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando la tecnología de hibridoma, tal como se describe por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975); Patente de Estados Unidos N° 4.376.110; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) y Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, por ejemplo, preparación y uso de transfectomas, u otros métodos conocidos por el experto. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); y Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pág. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluyen que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de la misma. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

[00131] En el modelo de hibridoma, un anfitrión tal como un ratón, un ratón inmunizado, un ratón transgénico con genes del sistema inmune humano, hámster, conejo, rata, camello o cualquier otro animal anfitrión apropiado, se inmuniza para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente al CXCR5. Como alternativa, los linfocitos puede inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pág. 59-103 (1986)).

[00132] En general, para preparar hibridomas productores de anticuerpos, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humanas. Las estirpes celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Típicamente se emplea una línea de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si la célula progenitora carece de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[00133] Son estirpes celulares inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable y de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas estirpes celulares de mieloma se encuentran líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. y células SP2/0, FO o X63-Ag8-653 disponibles en la colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

[00134] También se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Köszbor, J Immunol 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pág. 51-63 (1987)). También puede utilizarse la estirpe celular de mieloma de ratón NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

[00135] Otra alternativa es usar fusión eléctrica en lugar de fusión química para formar hibridomas. En lugar de fusión, una célula B puede immortalizarse utilizando, por ejemplo, el virus Epstein Barr u otro gen de transformación, ver, por ejemplo, Zurawaki et al., en Monoclonal Antibodies, ed., Kennett et al., Plenum Press, pág. 19-33. (1980). También pueden utilizarse ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas y ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) en los que se han trasplantado linfocitos B humanos.

[00136] El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR5. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA), análisis fluorocitométrico (FACS) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Estas técnicas son conocidas en este campo y están dentro de la experiencia del especialista. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal por CXCR5 puede determinarse, por ejemplo, por un análisis de Scatchard (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

[00137] Después se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pág. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden hacer crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

[00138] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan o se aíslan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, proteína G-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[00139] En la técnica existe una variedad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, de esta manera, la invención no se limita a su única producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. En este contexto, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariota, de fago o procariota.

[00140] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla

y se secuencian fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murinos, o tales cadenas de origen humano, humanizado u otras fuentes) (Innis et al. in PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), y Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). Las células de hibridoma sirven como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión que después se introducen por transfección en células anfitrionas tales como células *E. coli*, células NSO, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de melanoma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y dominios constantes de cadena ligera humana de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) o por medio de la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es una inmunoglobulina puede sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituir a los dominios variables de un sitio de combinación con CXCR5 de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

[00141] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región F_c para prevenir la reticulación en la cadena pesada. Como alternativa, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo aminoacídico o se eliminan para prevenir la reticulación.

[00142] Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconozcan epítomos específicos por técnicas conocidas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); y Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Por ejemplo, pueden producirse fragmentos F_{ab} y $F_{(ab')_2}$ de la invención por división proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos F_{ab}) o pepsina (para producir fragmentos $F_{(ab')_2}$). Los fragmentos $F_{(ab')_2}$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse directamente por células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de una colección de anticuerpos en fagos. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos $F_{(ab')_2}$ -SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F_{(ab')_2}$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992)). De acuerdo con otro método, pueden aislarse fragmentos $F_{(ab')_2}$ directamente a partir del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Para el experto serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento F_v monocatenario (F_v).

41
43

(documento WO 93/16185).

[00143] Para algunos usos, que incluyen que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible el uso de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos, ver, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); y las Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

[00144] Se derivan los anticuerpos humanizados de moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se unen al CXCR5, en donde una o más CDR se insertan en las regiones FR de una molécula de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en este campo incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EPO 239.400; WO 91/09967; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento (EPO 592.106; EPO 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); y Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332).

[00145] Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos de una fuente que no es humana. Los residuos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); y Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), al sustituir CDR no humanas o porciones de secuencias de CDR en lugar de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en donde los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen desde sitios análogos en anticuerpos de roedores. La región constante de cadena pesada que puede incluir uno o más dominios de cadena pesada y la región de bisagra pueden proceder de cualquier clase o subclase para obtener el efecto deseado, tal como una función efectora particular.

[00146] A menudo, los residuos de estructura en las regiones de estructura humanas pueden sustituirse por el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, y posiblemente mejorar, la unión a antígenos. Las sustituciones de estructura se identifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de la CDR y los residuos de estructura para identificar residuos de estructura importantes para la unión a antígenos y la comparación de secuencias, para identificar residuos de estructura inusuales en posiciones particulares, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; y Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

[00147] Además es preferible que los anticuerpos humanizados retengan alta afinidad por CXCR5, y retengan o adquieran otras propiedades biológicas favorables. Así, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas están disponibles comúnmente y los especialistas en la técnica estarán familiarizados con estos métodos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de las presentaciones permite el análisis del papel probable de ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influye en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse al CXCR5. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos FR procedentes del receptor e importarse secuencias de manera que se maximice la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana, aunque son los residuos de la CDR los que influyen directa y más sustancialmente en la unión de CXCR5. Las regiones CDR también pueden modificarse para contener uno o más aminoácidos que varían del obtenido del anticuerpo progenitor a partir del cual se obtiene la CDR, para proporcionar propiedades de interés mejores o diferentes, tales como unión de mayor afinidad o mayor avidez, por ejemplo.

[00148] Ciertas partes de las regiones constantes de un anticuerpo pueden manipularse y cambiarse para proporcionar homólogos, derivados, fragmentos de anticuerpo y similares con propiedades diferentes o mejores que las observadas en el anticuerpo progenitor. De esta manera, por ejemplo, muchos anticuerpos IgG4 forman enlaces disulfuro intracatenarios cerca de la región de bisagra. El enlace intracatenario puede desestabilizar la molécula bivalente progenitora formando moléculas monovalentes que comprenden una cadena pesada con la cadena ligera asociada. Estas moléculas pueden reasociarse, pero en una base aleatoria.

[00149] Se observa que modificar los aminoácidos en la región de bisagra de moléculas de IgG4 puede reducir la probabilidad de formación de enlaces intracatenarios, estabilizando de esta manera la molécula de IgG4, lo cual minimizará la probabilidad de formar moléculas biespecíficas. Esa modificación será benéfica si un anticuerpo terapéutico es una molécula de IgG4, ya que la mayor estabilidad minimizará la probabilidad de que la molécula se disocie durante la producción y fabricación, así como también *in vivo*. Un anticuerpo monovalente puede no tener la misma eficacia que la molécula progenitora bivalente. Por ejemplo, cuando se administra la IgG4 bivalente a un paciente, el porcentaje de IgG4 bivalente se reduce a aproximadamente 30% durante un periodo de dos semanas. Una sustitución de un aminoácido en la posición 228 intensifica la estabilidad de IgG4. La serina que reside en la posición 228 puede reemplazarse por otro aminoácido, tal como uno de los 19 aminoácidos restantes. Este cambio puede hacerse particularmente con anticuerpos recombinantes en los que la secuencia de ácido nucleico codificante puede mutarse para producir un aminoácido de reemplazo en la posición 228. Por ejemplo, la S puede reemplazarse por una prolina.

43
45

[00150] Otra serie de aminoácidos adecuados para la modificación incluyen aminoácidos en el área de la bisagra que afectan a la unión de una molécula que contiene una cadena pesada con la unión al receptor F_c y la internalización del anticuerpo unido. Estos aminoácidos incluyen, en las moléculas IgG1, los residuos de aproximadamente 233 a aproximadamente 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEC ID N°:49) de aproximadamente 252 a aproximadamente 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEC ID N°:50) y de aproximadamente 318 (Glu) a aproximadamente 331 (Pro), incluyendo, por ejemplo, Lys₃₂₀, Lys₃₂₂ y Pro₃₂₉.

[00151] Son particularmente convenientes los anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen los métodos de exhibición de fagos descritos anteriormente utilizando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana, ver las Patentes de Estados Unidos N° 4.444.887 y 4.716.111; y las patentes WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. También están disponibles la técnicas de Cole et al. y Boerder et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); y Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

[00152] También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que también expresan ciertos genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de cadena ligera y pesada humana. Los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de los locus de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos después se reproducen para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos, ver, por ejemplo, Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)).

[00153] Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un CXCR5, por ejemplo, todo o parte de CXCR5, tal como su dominio EC. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra CXCR5 a partir de los ratones transgénicos inmunizados utilizando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos, durante la diferenciación de linfocitos B se reordenan, y posteriormente experimentan mutación por cambio de clase y somática. Así, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para revisión,

ver Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). Para una discusión de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de protocolos para producir dichos anticuerpos, ver, por ejemplo, la WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; y WO 96/33735; EPO N° 0 598 877; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Adicionalmente, pueden contratarse compañías tales como Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra CXCR5 utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[00154] Además, podrían obtenerse mAb humanos inmunizando ratones en los que se han trasplantado leucocitos de sangre periférica, esplenocitos o médula ósea de origen humano (por ejemplo, por la técnica de trioma de XTL Biopharmaceuticals, Israel). Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada." En ese método, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

[00155] Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, pueden retirarse los desechos en forma de partículas, las células anfitrionas o los fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se expone pasta celular a acetato sódico (pH 3,5) y EDTA. El desecho celular puede retirarse por centrifugación. Cuando se secreta al medio la variante de anticuerpo, el sobrenadante de estos sistemas de expresión generalmente primero se concentra utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes extraños.

[00156] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La conveniencia de la proteína A o la proteína G como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de F_c de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. Puede utilizarse la proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Puede utilizarse la proteína G para isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero se dispone de otras matrices. Las matrices estables mecánicamente, tales como el vidrio de poros controlados o poli(estirenodivinil)benceno, permiten flujos más rápidos y tiempos

45
47

de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina agarosa en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo o la variante a recuperar.

[00157] Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo o la variante de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH utilizando un amortiguador de elución a un pH comprendido entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a baja concentración de sal (por ejemplo, una concentración de sal de aproximadamente 0-0,25 M).

[00158] Además, los anticuerpos de la invención, a su vez, pueden utilizarse para generar anticuerpos antiidiotipo que "imitan" al CXCR5 utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Greenspan et al., FASEB J 7:437 (1989); y Nissinoff, J Immunol 147:2429 (1991)). Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos que se unen y que inhiben competitivamente la multimerización y/o unión de un ligando al CXCR5 para generar antiidiotipos que "imitan" al CXCR5 y al dominio de unión y, como consecuencia, se unen y neutralizan CXCR5 y/o su ligando. Estos antiidiotipos de neutralización o fragmentos F_{ab} de estos antiidiotipos pueden utilizarse en regímenes terapéuticos, por ejemplo, para neutralizar CXCL13.

[00159] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión se dirige hacia CXCR5, y la otra puede ser para cualquier otro antígeno, tal como una proteína de la superficie celular, receptor, subunidad de receptor, ligando, antígeno con especificidad de tejido, proteína derivada de virus, proteína de envoltura codificada por virus, proteína de origen bacteriano, proteína de la superficie bacteriana etc. Así, la otra especificidad podría ser por CXCL13.

[00160] Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., Nature 305:537 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, los hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en la WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991). Se proporcionan otros métodos para obtener anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en Kufer et al., Trends Biotech

22:238-244, 2004.

[00161] Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3} . Puede ser que la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) contenga el sitio necesario para la unión de cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se utilizan para cotransformar un organismo anfitrión adecuado. Si se desean más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh et al., *Meth Enzym* 121:210 (1986).

[00162] La presente invención también contempla anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células indeseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, que incluyen los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o por medio de la formación de un enlace tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato, y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

[00163] Además, se pueden generar anticuerpos de un solo dominio contra CXCR5. Se han descrito ejemplos de esta tecnología en la WO9425591 para anticuerpos derivados de la cadena pesada de Ig de camélidos, así como en la US20030130496 que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de un solo dominio procedentes de colecciones de fagos.

[00164] Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); y Ward, et al., *Nature* 334:544 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman por unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región F_v a través de un enlace de aminoácido, dando como resultado un polipéptido monocatenario. También pueden utilizarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos F_v funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242:1038 (1988)).

[00165] La presente invención incluye anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como conjugaciones no covalentes) a un polipéptido. Pueden utilizarse anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención para facilitar la purificación, ver, por ejemplo, la WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., *Immunol Lett* 39:91 (1994); Patente de Estados Unidos N° 5.474.981; Gillies et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1428 (1992); y Fell et al., *J Immunol* 146:2446

(1991). La secuencia de aminoácidos marcadora puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), entre otros, de los que muchos están disponibles en el mercado, Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989). Otros marcadores de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, el marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y el denominado marcador "flag".

[00166] También se pueden crear moléculas de unión monocatenaria peptídica en las que se conectan las regiones F_v de cadena pesada y ligera. Se describen anticuerpos monocatenarios ("scF_v") y el método de su construcción, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778. Como alternativa, pueden construirse y expresarse F_{ab} por medios similares. Todos los anticuerpos total o parcialmente humanos pueden ser menos inmunogénicos que los mAb completamente murinos, y los fragmentos de anticuerpos monocatenarios también pueden ser menos inmunogénicos.

[00167] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de colecciones de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) y Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murinos y humanos, respectivamente, utilizando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). De esta manera, las técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[00168] Los anticuerpos anti-CXCR5 candidatos se ensayan por ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), FACS, inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas conocidas en la técnica. De esta manera, pueden utilizarse células B o células que expresan CXCR5 para detectar la unión de anticuerpos utilizando una técnica conocida, o CXCR5 expresado de manera recombinante, o una parte del mismo, tal como el dominio EC, puede adherirse a una fase sólida y utilizarse como elemento de captura en un ensayo, configurado según la elección del diseño.

[00169] Para determinar si un homólogo de anticuerpo particular se une al CXCR5 humano, puede utilizarse cualquier ensayo de unión convencional. Los ensayos de unión al CXCR5 útiles incluyen análisis FACS, ensayos ELISA, radioinmunoensayos y similares, que detectan la unión de un anticuerpo, y las funciones resultantes de los mismos, al CXCR5 humano. En estos ensayos son útiles formas de longitud completa y solubles de CXCR5 humano enseñado aquí. La unión de un anticuerpo u homólogo al CXCR5, o a fragmentos solubles del mismo, puede detectarse de manera conveniente por medio del uso de un segundo anticuerpo específico para inmunoglobulinas de la especie de la que procede el anticuerpo u homólogo.

[00170] Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular bloquea o no

bloquea significativamente la unión de CXCL13 u otro ligando al CXCR5 humano, puede utilizarse cualquier ensayo competitivo adecuado. Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, ensayos ELISA, ensayos FACS, radioinmunoensayos y similares, que cuantifican la capacidad del anticuerpo u homólogo de competir con CXCL13 u otro ligando por la unión al CXCR5 humano. Preferiblemente, se mide la capacidad de un ligando de bloquear la unión de CXCR5 humano marcado a un anticuerpo u homólogo inmovilizado.

[00171] La capacidad de un anticuerpo u homólogo de unirse al CXCR5 humano puede evaluarse ensayando su capacidad de unirse a células CXCR5⁺ humanas. Son células CXCR5⁺ adecuadas para uso en la determinación de si un anticuerpo u homólogo particular se une al CXCR5 humano células de cultivo de tejidos de mamíferos transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y que expresan CXCR5 sobre la superficie celular o estirpes celulares B.

[00172] La unión del anticuerpo u homólogo a la célula CXCR5⁺ puede detectarse tiñendo las células con un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia específica para inmunoglobulinas de la misma especie de la que procede el homólogo de anticuerpo que se está ensayando. Puede utilizarse un separador de células activadas por fluorescencia ("FACS") para detectar y cuantificar cualquier unión, ver, en general, Shapiro, Practical Flow Cytometry, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. (1985).

[00173] Además, la capacidad de un homólogo de anticuerpo de bloquear la unión de un ligando, tal como CXCL13, al CXCR5 humano puede determinarse preincubando el exceso de ligando con células CXCR5⁺ y cuantificando el grado en el que el ligando unido bloquea la unión del anticuerpo u homólogo a las células. La unión del anticuerpo u homólogo a las células CXCR5⁺ puede cuantificarse por análisis FACS utilizando un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia específica para inmunoglobulinas de la misma especie de la que procede el homólogo de anticuerpo que se está ensayando. Como alternativa, puede configurarse un ensayo competitivo utilizando un ligando o anticuerpo marcado como se conoce en la técnica.

[00174] Un ligando, tal como CXCL13, utilizado en los ensayos anteriores puede proporcionarse por las células transformadas con el gen del ligando, puede ser un CXCL13 aislado, obtenido poniendo en práctica los métodos enseñados aquí, o puede adquirirse en el mercado.

[00175] Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular no produce una reducción significativa en el número de células CXCR5⁺ circulantes *in vivo*, se cuantifica el número de células CXCR5⁺ circulantes aisladas a partir de un mamífero en las 24 horas posteriores a la administración del anticuerpo u homólogo a un mamífero que tiene una función inmune normal, y se compara con el número antes de la administración o con el número en un mamífero de control al que se ha administrado un anticuerpo u homólogo de isotipo correspondiente de especificidad irrelevante en lugar de un anticuerpo u homólogo de la presente invención. La cuantificación de células CXCR5⁺ en animales que han recibido la dosificación de un anticuerpo para CXCR5 o una parte funcional o derivado del mismo puede realizarse, por ejemplo, por ténido de las células obtenidas con anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen a los anticuerpos anti-CXCR5,

4/51

así como anticuerpos marcados específicos para las células T y las células B, seguido de análisis FACS.

[00176] Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en términos de los epítomos o partes de CXCR5 reconocidas o a las que se une específicamente el anticuerpo. El epítomo o epítomos o la parte o partes de polipéptido pueden especificarse como se describe aquí, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal, por tamaño en residuos aminoácidos contiguos, epítomos conformacionales y así sucesivamente.

[00177] Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de reactividad cruzada. También se incluyen en la presente invención anticuerpos que se unen a polipéptidos CXCR5, que tienen una identidad de por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 65%, por lo menos 60%, por lo menos 55% y por lo menos 50% (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos aquí) con CXCR5.

[00178] Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de la afinidad de unión a un CXCR5 de interés. Los anticuerpos anti-CXCR5 pueden unirse con una K_D menor de aproximadamente 10^{-7} M, menor de aproximadamente 10^{-6} M, o menor de aproximadamente 10^{-5} M. Pueden ser benéficas mayores afinidades de unión en un anticuerpo de interés, tales como las que tienen una constante de disociación en equilibrio o K_D de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-15} M, de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-12} M, de aproximadamente 10^{-9} a aproximadamente 10^{-11} M, o de aproximadamente 10^{-8} a aproximadamente 10^{-10} M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítomo de la invención, como se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, los inmunoensayos descritos aquí. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítomo en por lo menos 95%, por lo menos 90%, por lo menos 85%, por lo menos 80%, por lo menos 75%, por lo menos 70%, por lo menos 60% o por lo menos 50%.

[00179] La presente invención también incluye conjugados que comprenden un anticuerpo de interés. Los conjugados comprenden dos componentes primarios, un anticuerpo de interés y un segundo componente, que puede ser un agente de unión a las células, un agente citotóxico y similares.

[00180] Como se usa aquí, la expresión “agente de unión a célula” se refiere a un agente que reconoce específicamente y se une a una molécula en la superficie de la célula. De esta manera, el agente de unión a célula puede ser un antígeno CD, un antígeno de patógeno, tal como un antígeno de virus, un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer, un antígeno con especificidad de célula, un antígeno con especificidad de tejido, una molécula Ig o de tipo Ig y similares.

[00181] En una realización, el agente de unión a la célula reconoce específicamente CXCL13 o el complejo de CXCR5 y un ligando del mismo, tal como CXCL13. El conjugado puede estar en contacto con la célula diana durante un periodo suficiente para permitir que una función

efectora del conjugado actúe sobre la célula, y/o para permitir que el conjugado esté durante un periodo suficiente como para la célula lo internalice.

[00182] Los agentes de unión a las células pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se está conociendo, e incluye péptidos, no péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, ligandos, receptores y similares, o combinaciones de los mismos. El agente de unión a las células puede ser cualquier compuesto que puede unirse a una célula, de una manera específica o no específica. Generalmente, el agente puede ser un anticuerpo (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia que se una a las células.

[00183] Otros ejemplos de agentes de unión a las células que pueden utilizarse incluyen: anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales; y fragmentos de anticuerpos tales como F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab)2}$ y F_v (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230 -244 (1960)).

[00184] El segundo componente también puede ser un agente citotóxico. El término "agente citotóxico" como se usa aquí se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o crecimiento, de las células y/o produce la destrucción de las células. De esta manera, el agente citotóxico puede ser un taxol, a maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065, una ricina, mitomicina C y similares. En algunas realizaciones, el agente citotóxico, como ocurre con cualquier agente de unión de un conjugado de la presente invención, se une covalentemente, directamente o a través de un ligador escindible o no escindible, a un anticuerpo de interés.

[00185] Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides inhiben la formación de microtúbulos y son muy tóxicos para las células de mamífero.

[00186] Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados están descritos en las Patentes de EEUU Nos. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

[00187] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-descloro (Patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparado, por ejemplo, por reducción con LAH de ansamitocina P2); (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/- C-19-descloro (Patentes de Estados Unidos N° 4.361.650 y 4.307.016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación utilizando Streptomyces o Actinomyces o descloración utilizando hidruro de litio y aluminio (LAH)); y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (Patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación utilizando cloruros de acilo).

[00188] Los ejemplos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen: (1) C-9-SH (Patente de Estados Unidos N° 4.424.219)

4/5

(preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); (2) C-14-alcoximetil (desmetoxi/CH₂OR) (Patente de Estados Unidos N° 4.331.598); (3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparado en Nocardia); (4) C-15-hidroxi/aciloxi (Patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por Streptomyces); (5) C-15-metoxi (Patentes de Estados Unidos N° 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de Trewia nudiflora); (6) C-18-N-desmetil (Patentes de Estados Unidos N° 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y (7) 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos N° 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

[00189] Los conjugados citotóxicos se pueden preparar mediante métodos *in vitro*. Para unir un agente citotóxico, fármaco o profármaco al anticuerpo, comúnmente se usa un grupo de unión. Los grupos de unión adecuados son conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterases. Por ejemplo, pueden construirse conjugados utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre un anticuerpo de interés y el fármaco o profármaco.

[00190] Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o variante funcional del mismo como se describe aquí, construcciones de vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos de unión al CXCR5 de la presente invención, células anfitrionas que comprenden dicho vector, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido.

[00191] El vector normalmente contiene componentes conocidos en la técnica y generalmente incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes elementos: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores o de selección, secuencias que facilitan y/o mejoran la traducción, un elemento potenciador y similares. De esta manera, los vectores de expresión incluyen una secuencia de nucleótidos unida de manera funcional a dichas secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o la traducción adecuadas tales como las derivadas de genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras adicionales incluyen operadores, sitios de unión a ribosomas de ARNm, y/u otras secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción, tales como la iniciación y la terminación. Las secuencias de nucleótidos están "unidas de manera funcional" cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de nucleótidos para el polipéptido apropiado. De esta manera, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a, por ejemplo, la secuencia de la cadena pesada de anticuerpo si la secuencia promotora controla la transcripción de esa secuencia de nucleótidos.

[00192] Además, en los vectores de expresión pueden incorporarse secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no están asociados de manera natural con las secuencias de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para un péptido señal (líder de secreción) puede fusionarse en fase con la secuencia polipeptídica de manera que el

82
54

anticuerpo se secrete en el espacio periplásmico o al medio. Un péptido señal que es funcional en la célula anfitriona deseada aumenta la secreción extracelular del anticuerpo apropiado o de una parte del mismo. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras la secreción del anticuerpo por la célula. Los ejemplos de estas señales de secreción son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

[00193] El vector puede ser un plásmido, un vector viral monocatenario o bicatenario, un ARN monocatenario o bicatenario o un vector de fago de ADN, un fagémido, un cósmido o cualquier otro vehículo de un transgén de interés. Estos vectores pueden introducirse en las células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para introducir ADN o ARN en las células. Los vectores, en el caso de los vectores de fago y virales, también pueden introducirse en las células como virus empaquetados o encapsulados por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso, generalmente sólo tendrá lugar la propagación viral en la complementación de células anfitrionas y en el uso de vectores plurales que llevan los diversos componentes de virus necesarios para producir una partícula. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir la proteína utilizando ARN derivados de las presentes construcciones de ADN (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos N° 5.122.464).

[00194] Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en cualquier célula anfitriona adecuada. Los ejemplos de células anfitrionas útiles en la presente invención incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores e incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, así como bacilos, *Pseudomonas* y *Streptomyces*) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo de interés; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora* y hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*) transformados con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, *Baculovirus*) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; o virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5K del virus vaccinia).

[00195] Los vectores de expresión para uso en células anfitrionas procariotas

57
57

generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípicos. Un gen marcador de selección fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que proporciona un requisito autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células anfitrionas procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) y la serie de vectores pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); y Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Las secuencias de promotor utilizadas comúnmente para vectores de expresión de células anfitrionas procariotas recombinantes incluyen el sistema promotor de T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)), de β -lactamasa (penicilinas) y de lactosa (Chang et al., Nature 275:615 (1978); y Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), y el promotor tac (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

[00196] Los vectores de levadura a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación, tal como el del plásmido de levadura 2μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para los vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Se describen otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras se describen en Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y para los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de estos protocolos se describe por Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), que selecciona transformantes Trp^+ en un medio selectivo.

[00197] Se puede utilizar cualquier cultivo de células eucariotas, ya sea un cultivo de células de vertebrados o de invertebrados. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pág. 277-9, Plenum Publishing (1986); y Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Por ejemplo, pueden utilizarse sistemas de Baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insecto, puede utilizarse el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Otros anfitriones que se han identificado incluyen *Aedes*, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*. Están disponibles para el público varias cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de

54
56

AcNPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV. Además, también pueden utilizarse como anfitriones los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco, como se conoce en la técnica.

[00198] Los cultivos de las células de vertebrados y para la propagación de las células de vertebrados (cultivo tisular) pueden realizarse por medio de un procedimiento rutinario, aunque existen estirpes celulares fastidiosas que requieren, por ejemplo, un medio especializado con factores únicos, células de alimentación y similares, véase Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Son ejemplos de estirpes celulares anfitrionas células anfitrionas de mamífero útiles riñón de mono; línea de riñón embrionario humano; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón; células de carcinoma cervical humano (por ejemplo, HeLa); células de riñón de perro; células de pulmón humano; células hepáticas humanas; tumor mamario de ratón; y células NSO.

[00199] Las células anfitrionas se transforman con vectores para la producción de anticuerpo y se cultivan en medio nutriente convencional que contiene factores de crecimiento, vitaminas, minerales y similares, así como inductores apropiados para las células y los vectores usados. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras utilizadas comúnmente proceden del virus de polioma, Adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Pueden utilizarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula anfitriona de mamífero, por ejemplo, el origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, sitios de corte y empalme y poliadenilación. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles porque se obtienen fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral. Están disponibles en el mercado vectores de expresión ejemplares para uso en células anfitrionas de mamífero.

[00200] Para el cultivo de las células anfitrionas son adecuados medios disponibles en el mercado tales como medio F10 de Ham, Medio Esencial Mínimo (MEM), RPMI-1640 y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth Enzymol 58:44 (1979) y Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), y en las Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728 puede utilizarse como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios puede suplementarse cuando sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros, tales como cloruro de sodio, calcio o magnesio; y fosfatos), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas, según la elección del diseño. Las condiciones de cultivo tales como la temperatura, el pH y similares, son las conocidas en la técnica

5X/55

apropiada para la célula y las que permiten la expresión deseada del transgén.

[00201] Los polinucleótidos de interés pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., *Bio/Techniques* 17:242 (1994)) y después amplificando los oligonucleótidos ligados, por ejemplo, por PCR.

[00202] Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de un ácido nucleico de una célula que lo expresa. Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada, tal como una colección, que puede ser una específica para las células productoras de anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención. Pueden configurarse cebadores adecuados para la amplificación por PCR. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR después pueden clonarse en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido en la técnica.

[00203] Una vez que se han determinado la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse para obtener los equivalentes de interés descritos aquí utilizando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagenia dirigida, PCR etc. (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); y Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1998) para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

[00204] La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o de cadena ligera puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por métodos bien conocidos, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. utilizando técnicas de ADN recombinantes rutinarias, una o más de las CDR pueden insertarse dentro de regiones de estructura, por ejemplo, en regiones de estructura humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se ha descrito *supra*. El polinucleótido de interés generado por la combinación de las regiones de estructura y una o más CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al CXCR5, o por lo menos el dominio ED del mismo. Por ejemplo, estos métodos pueden utilizarse para realizar sustituciones o eliminaciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios.

[00205] Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden utilizarse para detectar CXCR5, y por lo tanto células que expresan CXCR5, en una muestra

46/58

biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el anticuerpo anti-CXCR5 de la invención se usa para determinar la presencia y el nivel de CXCR5 en un tejido o en células derivadas del tejido. Los niveles de CXCR5 en el tejido o biopsia pueden determinarse, por ejemplo, en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o la biopsia de éste puede ser congelado o fijado. Estos mismos u otros métodos pueden utilizarse para determinar otras propiedades de CXCR5, tales como su nivel, la localización celular, los niveles de ARNm, sus mutaciones y similares.

[00206] El método descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe o que se sospecha que tiene un cáncer, donde el nivel de CXCR5 medido en dicho paciente se compara con el de un sujeto de referencia normal o patrón. El ensayo de interés también puede utilizarse para diagnosticar artritis u otra enfermedad autoinmune caracterizada por infiltración y concentración de células B, junto con el desarrollo de tejido linfóide diferenciado.

[00207] La presente invención además proporciona anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítopos de los mismos que están marcados adicionalmente para uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En algunas realizaciones, el marcador es un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ion metálico.

[00208] También se proporciona un método de diagnóstico en el que dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión a epítipo de los mismos se administran a un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, artritis, enfermedades autoinmunes u otra enfermedad asociada con CXCR5, y se mide o se controla la distribución del marcador dentro del cuerpo del sujeto.

[00209] El anticuerpo y los fragmentos del mismo de la presente invención pueden utilizarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina de dextrano o de agarosa o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene CXCR5 o células que lo llevan que se van a purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el CXCR5 o la célula a purificar, que están unidas al anticuerpo inmovilizado de interés. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como amortiguador glicina, pH 5,0, que liberará el CXCR5 o la célula del anticuerpo de interés.

[00210] Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo de interés típicamente se marcará con un marcador detectable. Se dispone de numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como ^{36}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I (el anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo utilizando técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), por ejemplo, y la radiactividad puede medirse utilizando recuento de centelleo); (b) marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo de texas, pudiendo conjugarse los marcadores

84

fluorescentes con el anticuerpo utilizando una técnica descrita en Current Protocols in Immunology, *supra*, por ejemplo, donde la fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro; y (c) diversos marcadores de sustratos enzimáticos que están disponibles (la Patente de Estados Unidos N° 4.275.149 proporciona una revisión), catalizando generalmente la enzima una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas, por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente, o la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia, por ejemplo, utilizando un luminómetro, o el marcador dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos en O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

[00211] Cuando se usan estos marcadores, se dispone de sustratos adecuados, tales como: (i) en el caso de la peroxidasa de rábano picante, se usa hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, clorhidrato de ortofenilen diamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB)); (ii) en el caso de la fosfatasa alcalina (AP), se usa p-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico tal como 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[00212] Los especialistas en la técnica disponen de otras combinaciones de enzima-sustrato. Como revisión general, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.275.149 y 4.318.980.

[00213] Algunas veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de los indicadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de esta manera, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esa manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta del marcador, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores o indicadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-digoxina. De esta manera, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo o muteína utilizando un segundo anticuerpo.

[00214] En otra realización de la invención, el anticuerpo no necesita marcarse, y su presencia puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo, otra forma de segundo anticuerpo.

[00215] Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e

indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

[00216] Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado de competir con la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición. Como resultado, el patrón y la muestra de ensayo que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y las muestras de ensayo que permanecen sin unir.

[00217] Los ensayos de tipo captura implican el uso de dos anticuerpos, siendo cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, determinante o epítipo, de el objetivo a detectar. En un ensayo de tipo captura, la muestra de ensayo a analizar se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza directa o indirectamente en un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo marcado directa o indirectamente se une a la muestra de ensayo unida, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado a su vez con un resto detectable (ensayo de tipo captura directo) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina u otro miembro adecuado del par de unión (anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, enzima/sustrato, por ejemplo) que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo captura indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo captura es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

[00218] Para inmunohistoquímica, la muestra de célula o de tejido puede ser reciente o puede estar congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante tal como, por ejemplo, formalina.

[00219] Los anticuerpos también pueden utilizarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el mutante de anticuerpo se marca con un radionucleótido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de manera que puedan localizarse los sitios que expresan CXCR5 utilizando inmunoescintigrafía.

[00220] La presente invención también incluye kits, por ejemplo, que comprenden un anticuerpo, fragmento del mismo, homólogo, derivado del mismo y similares, tales como un conjugado marcado o citotóxico, e instrucciones para uso del anticuerpo, conjugado para destruir tipos celulares particulares y similares. Las instrucciones pueden incluir orientaciones para usar el anticuerpo, conjugado y similares *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El anticuerpo can estar en forma líquida o como un sólido, generalmente liofilizado. el equipo puede contener otros reactivos adecuados tales como un amortiguador, una solución de reconstitución y otros ingredientes necesarios para el uso deseado. Se contempla una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso, tal como para el uso terapéutico o para realizar un ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado, tal como con una enzima, el equipo puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que

proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o un amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse para proporcionar concentrados de una solución de reactivo que proporciona flexibilidad al usuario, economía de espacio, economía de reactivos y similares. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes, que tras la disolución proporcionan una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

[00221] Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un mamífero. En una realización, el anticuerpo o equivalente de interés se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos ejemplares a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Estos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo, o pueden utilizarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de la dosis en el mamífero.

[00222] Un anticuerpo con o sin un segundo componente, tal como un resto terapéutico conjugado con el mismo, administrado solo o en combinación con uno o más factores citotóxicos puede utilizarse como agente terapéutico. La presente invención se refiere a terapias basadas en anticuerpos que implican administrar anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección mediada por CXCR5. El animal o sujeto puede ser un mamífero que necesita un tratamiento particular, tal como un mamífero al que se le ha diagnosticado un trastorno particular, por ejemplo, uno relacionado con CXCR5. Los anticuerpos dirigidos contra CXCR5 son útiles, por ejemplo, para la profilaxis o tratamiento de artritis, enfermedades inflamatorias, en general, rechazo de injertos, cáncer y trastornos autoinmunes. Por ejemplo, por medio de la administración de una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo anti-CXCR5 de la presente invención, o una mezcla de una pluralidad de los anticuerpos de la presente invención o equivalentes de los mismos, o en combinación con otros anticuerpos de diversos orígenes, pueden mejorarse o prevenirse síntomas de enfermedades en el animal tratado, en particular en seres humanos.

[00223] Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos, equivalentes y derivados de los mismos como los descritos aquí) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención como los descritos aquí (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos) y anticuerpos antiidiotipo como los descritos aquí. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con una expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, que incluyen, pero no se limitan a, una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones descritas aquí. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5 incluye, pero sin limitación, el alivio de por lo menos un síntoma asociado con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los

anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica o como se describe aquí. La expresión "fisiológicamente aceptable," "farmacológicamente aceptable" y similares significa aprobado por la agencia reguladora del gobierno federal o de un gobierno estatal o como se indica en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales y más particularmente en seres humanos.

[00224] El anticuerpo anti-CXCR5 puede administrarse a un mamífero de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, la vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, inhalación y oral, y si se desea para el tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, a través de la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. la administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluyen inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por medio de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Además, el anticuerpo se administra convenientemente por infusión pulsátil, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se administra por inyección, preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

[00225] Se conocen otros sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); y Lopez-Berestein, ibid., p. 317-327) y células recombinantes capaces de expresar el compuesto; endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)); construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector etc.

[00226] Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coascervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osal, Ed. (1980).

[00227] También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, por medio del uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. El

4
67

anticuerpo también puede administrarse en los pulmones de un paciente en forma de una composición en polvo seco, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.514.496.

[00228] En una realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; lo cual puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluyen membranas tales como membranas silásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales que no absorban o adsorban la proteína.

[00229] En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); y Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer et al., eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983); véase también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann Neurol 25:351 (1989); y Howard et al., J Neurosurg 71:105 (1989)). En otra realización, puede ponerse un sistema de liberación controlada cerca de el objetivo terapéutica.

[00230] Pueden prepararse formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" opcionales empleados típicamente en la técnica, es decir, agentes amortiguantes, agentes estabilizantes, conservantes, agentes de isotonicidad, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, ed. (1980). Estos aditivos generalmente son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, por lo tanto, los excipientes, diluyentes, vehículos y similares son farmacéuticamente aceptables.

[00231] Un anticuerpo "aislado" o "purificado" carece sustancialmente de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la célula o tejido original o del medio del que procede la proteína, o carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el polipéptido/proteína está separado de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. De esta manera, un anticuerpo que carece sustancialmente de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% (en peso seco) de la proteína contaminante. Cuando el anticuerpo se produce de manera recombinante, también carece preferiblemente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo

61

representa menos de aproximadamente 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, preferiblemente carece sustancialmente de precursores químicos u otros agentes químicos y reactivos, es decir, el anticuerpo de interés se separa de precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, estas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos se aíslan o purifican.

[00232] Como se usa aquí, la expresión "niveles de bajos a indetectables de agregación" se refiere a muestras que contienen no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% y con frecuencia no más de 0,5% de agregación, por peso de proteína, medido, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución (HPSEC).

[00233] Como se usa aquí, la expresión "niveles de bajos a indetectables de fragmentación" se refiere a muestras que contienen una cantidad igual o mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, de la proteína total, por ejemplo, en un solo pico, como se determina por HPSEC, o en dos (2) picos (cadena pesada y cadena ligera), por ejemplo, por electroforesis capilar en gel reducido (rCGE) y que no contiene ningún otro pico individual con más de 5%, más de 4%, más de 3%, más de 2%, más de 1% o más de 0,5% de la proteína total. La rCGE como se usa aquí se refiere a electroforesis capilar en gel en condiciones reductoras suficientes para reducir enlaces disulfuro en un anticuerpo o molécula de tipo anticuerpo o derivada de un anticuerpo.

[00234] Como se usa aquí, los términos "estabilidad" y "estable", en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo para CXCR5 o un fragmento de unión del mismo, se refieren a la resistencia del anticuerpo o del fragmento de unión a antígenos del mismo en la formulación al desplegamiento térmico o químico, agregación, degradación o fragmentación en unas condiciones específicas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones "estables" de la invención retienen una actividad biológica igual o mayor de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% en unas condiciones específicas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. La estabilidad de dicha preparación de anticuerpo puede evaluarse por grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, rCGE, electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia.

[00235] El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Estos vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen los procedentes del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo adecuado cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente en caso de soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta,

163
65

arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguantes del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, depósitos y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Se describen ejemplos de vehículos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Martin. Estas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Como se conoce en la técnica, la formulación se construirá para adecuarse al modo de administración.

[00236] Los agentes amortiguantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Los amortiguadores están presentes preferiblemente a un intervalo de concentraciones de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes amortiguantes adecuados para uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos, y sales de los mismos, tales como amortiguadores citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico etc.), amortiguadores succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico etc.), amortiguadores tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico etc.), amortiguadores fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico etc.), amortiguadores gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico etc.), amortiguadores oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico etc.), amortiguadores lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico etc.) y amortiguadores acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico etc.). Pueden utilizarse amortiguadores fosfato, amortiguadores carbonato, amortiguadores de histidina, sales de trimetilamina tales como Tris, HEPES y otros de estos amortiguadores conocidos.

[00237] Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades que varían de 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo,

66

cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

[00238] Están presentes agentes de isotonicidad para asegurar la isotonicidad fisiológica de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcohol de azúcares polihidroxílicos, preferiblemente alcoholes de azúcares trihidroxílicos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los alcoholes polihidroxílicos pueden estar presentes en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25%, en peso, preferiblemente de 1% a 5% teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes.

[00239] Los estabilizantes se refieren a una categoría amplia de excipientes que pueden cambiar en función de un agente para proporcionar volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihidroxílicos; aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, arabitol, eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, que incluyen ciclitales tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, sacáridos, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano y similares. Los estabilizantes están presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 p/p por parte de proteína activa.

[00240] Otros diversos excipientes incluyen agentes para proporcionar volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina o vitamina E) y codisolventes.

[00241] La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo cuando sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente los que tienen actividades complementarias que no interfieren de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Estas moléculas convenientemente están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin para el que están destinadas.

[00242] Como se usa aquí, el término "tensioactivo" se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, particularmente se componen de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos a menudo se

usan como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

[00243] Pueden añadirse tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger al agente terapéutico frente a la agregación inducida por agitación, lo cual también permite que la formulación se exponga a tensiones de cizalla en la superficie sin que se produzca desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80 etc.), poloxámeros (184, 188 etc.), polioles Pluronic® y monoéteres de polioxietileno sorbitano (TWEEN-20®, TWEEN-80® etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

[00244] Como se usa aquí, la expresión "sal inorgánica" se refiere a cualquier compuesto, que no contiene carbono, que resulta del reemplazo de parte o todo el hidrógeno ácido o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal, y a menudo se usa como un compuesto que ajusta la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH₂PO₄ etc.

[00245] La presente invención proporciona formulaciones líquidas de un compuesto de unión a anti-CXCR5 o un fragmento del mismo, que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, o de aproximadamente 5,5 a 6,5, o de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, o de aproximadamente 6,0.

[00246] La presente invención incluye formulaciones líquidas que tienen estabilidad a temperaturas encontradas en un refrigerador y congelador comercial como el encontrado en la oficina de un médico o en un laboratorio, tal como de aproximadamente -20° C a aproximadamente 5° C, evaluándose dicha estabilidad, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC), con fines de almacenamiento, tal como durante aproximadamente 60 días, durante aproximadamente 120 días, durante aproximadamente 180 días, durante aproximadamente un año, durante aproximadamente 2 años o más. Las formulaciones líquidas de la presente invención también presentan estabilidad, como se evalúa, por ejemplo, por HSPEC, a temperatura ambiente, durante por lo menos unas pocas horas, tal como una hora, dos horas o aproximadamente tres horas antes del uso.

[00247] La expresión "molécula pequeña" y expresiones análogas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluyen compuestos heteroorgánicos y/o ganometálicos) que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1.00 gramo por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables

de estos compuestos.

[00248] De esta manera, en el caso de un cáncer, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos para cánceres, que incluyen agentes quimioterapéuticos convencionales (paclitaxel, carboplatino, cisplatino y doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinib, erlotinib y cetuximab), agentes anti-angiogenia (bevacizumab y sunitinib), así como agentes inmunomoduladores tales como interferón- α y talidomida.

[00249] En otra realización, en el caso de enfermedades reumáticas, tal como artritis reumatoide (RA), se puede utilizar una terapia de combinación que comprende una molécula de unión al CXCR de interés. Por ejemplo, un anticuerpo CXCR5 humanizado puede ser dosificada con una molécula pequeña, tal como un fármaco antirreumático que modifica la enfermedad, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, inhibidores de síntesis de piridina y metrotocato, tal como, leflunomida (Mader & Keystone, J Rheum 34 Supp(16-24) 2007, Gaffo et al., Am J Health Syst Phann 63-2451-2465, 2006).

[00250] Debido a varias formas de una molécula de de unión al CXCR5 de interés pueden no ser moléculas que agotan la célula B, la presente molécula se puede combinar con otros fármacos que tiene mecanismos trasladantes de acción para producir un punto final aditivo o sinérgico. Por lo tanto, por ejemplo, un segundo fármaco puede ser uno que actúe en el nivel de una citosina, en el eje de la célula T y así sucesivamente.

[00251] Como se usa aquí, las expresiones "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente que pueda utilizarse en el tratamiento, curación o mejoría de una enfermedad, trastorno, malestar y similar asociado con un metabolismo y actividad aberrante de CXCR5 y/o CXCL13. Esto puede manifestarse en niveles anómalos de células B o en una actividad anómala de células B. También se incluyen compuestos conocidos con un efecto farmacológico en el tratamiento de un trastorno y similares que está asociado con el metabolismo y actividad aberrante de CXCR5 y/o CXCL13.

[00252] Además, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con diversas moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas, ver, por ejemplo, los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de Estados Unidos N° 5.314.995; y documento EPO 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo (por ejemplo, emisores α tales como, por ejemplo, ^{213}Bi). Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracendiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos y homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-

fluorouracilo y dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, daunomicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, actinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

[00253] Las técnicas para conjugar este resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas, ver, por ejemplo, Arnon et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., en *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985); y Thorpe, et al., *Immunol Rev* 62:119 (1982). Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo, tal como un anticuerpo bifuncional, ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

[00254] Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y el agente terapéutico o resto de fármaco no debe considerarse limitado a los agentes quimioterapéuticos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (documento WO 97/33899), AIM II (documento WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGF (documento WO 99/23105); un agente trombótico; un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF) u otros factores de crecimiento.

[00255] Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración utilizando un filtro de 0,2 μm o de 0,22 μm .

[00256] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o matrices. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-

glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (tales como microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque ciertos polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando residuos sulfhidrilo, por liofilización de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, por sustitución de aminoácidos y creando composiciones de matrices poliméricas específicas.

[00257] La composición de anticuerpo o de variante se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos especialistas. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o variante a administrar vendrá dictada por estas consideraciones, y puede ser la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad, afección o trastorno mediado por CXCR5.

[00258] El anticuerpo o variante, opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores discutidos anteriormente. Generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con las vías de administración utilizadas anteriormente aquí o de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[00259] Como se usa aquí, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad mediada por CXCR5, mejorar uno o más síntomas de dicha enfermedad, prevenir el avance de una enfermedad mediada por CXCR5 o causar la regresión de una enfermedad mediada por CXCR5, o que es suficiente para prevenir el desarrollo, recurrencia, inicio o progresión de una enfermedad mediada por CXCR5 o uno o más síntomas de la misma, o mejorar o potenciar los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad mediada por CXCR5. Por ejemplo, un tratamiento de interés puede reducir los niveles elevados de células B, basándose en un nivel basal o normal, por lo menos 5%, preferiblemente por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 100%. En otra realización, una cantidad eficaz de un agente terapéutico

o profiláctico reduce los síntomas de una enfermedad mediada por CXCR5, tal como artritis o rechazo de injerto por lo menos 5%, preferiblemente por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o por lo menos 100%. También se usa aquí como equivalente la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”.

[00260] La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será eficaz en el uso o tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Cuando sea posible, debe realizarse una curva de dosis-respuesta y las composiciones farmacéuticas de la invención primero deben prepararse *in vitro*. Si se dispone de un modelo animal adecuado, de nuevo puede obtenerse una curva de dosis-respuesta y utilizarse para extrapolar una dosis humana adecuada poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, basándose en el conocimiento común de la técnica, una composición farmacéutica eficaz para promover una disminución de un efecto inflamatorio, por ejemplo, puede proporcionar una concentración local de agente terapéutico comprendida entre aproximadamente 5 y 20 ng/ml, y preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 ng/ml. En otra realización específica de la invención, una composición farmacéutica eficaz para mejorar el crecimiento y la supervivencia de células responsables de manifestaciones autoinmunes dependientes de células B o del rechazo de injertos puede proporcionar una concentración local de agente terapéutico comprendida entre aproximadamente 10 ng/ml y aproximadamente 100 ng/ml.

[00261] En una realización preferida, puede administrarse una solución acuosa del polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo por inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación puede determinarse empíricamente para la enfermedad particular, la población de pacientes, el modo de administración y similares, poniendo en práctica métodos farmacéuticos conocidos en la técnica.

[00262] El programa de dosificación para administración subcutánea puede variar de una vez por semana a diariamente dependiendo de varios factores clínicos que incluyen el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

[00263] La presente invención proporciona métodos para preparar formulaciones líquidas del anticuerpo o fragmento de unión al CXCR5 del mismo, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción de anticuerpo purificado a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml o mayor

utilizando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un límite de peso molecular (pm) apropiado (por ejemplo, un límite de 30 kD para fragmentos $F_{(ab)2}$; y un límite de 10 kD para fragmentos F_{ab}) y, opcionalmente, diafiltrar la fracción de anticuerpo concentrada en el amortiguador de formulación utilizando la misma membrana.

[00264] Además, la presente invención también incluye formulaciones líquidas estables de los productos de interés que tienen una mejor vida media *in vivo*. De esta manera, el anticuerpo de interés tiene una vida media en un sujeto, preferiblemente a ser humano, mayor de 3 días, mayor de 7 días, mayor de 10 días, mayor de 15 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses, mayor de 5 meses o mayor.

[00265] Para prolongar la circulación en suero de un anticuerpo *in vivo*, pueden utilizarse varias técnicas. Por ejemplo, pueden unirse moléculas de polímero inerte, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, a un anticuerpo con o sin un ligador multifuncional por medio de una conjugación con especificidad de sitio del PEG al extremo N o al extremo C del anticuerpo o a través de grupos ϵ amino presentes en residuos de lisina. Puede utilizarse derivación de polímeros lineal o ramificada que ocasiona una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede controlarse de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados con PEG pueden ensayarse con respecto a la actividad de unión así como con respecto a la eficacia *in vivo* utilizando métodos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos descritos aquí.

[00266] También puede generarse un anticuerpo con una mayor vida media *in vivo* introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a F_cR del mismo (tal como un fragmento de F_c o un fragmento de dominio F_c de bisagra), ver, por ejemplo, los documentos WO 98/23289; WO 97/34631; y la Patente de Estados Unidos N° 6.277.375.

[00267] Además, un anticuerpo puede conjugarse con albúmina para hacer que el anticuerpo sea más estable *in vivo* o tenga una mayor vida media *in vivo*. Las técnicas son conocidas en este campo, véanse por ejemplo los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y EPO 413. 622. El anticuerpo también puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, división proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, y similares.

[00268] En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también incluye un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína u otro anestésico "caína" para evitar el dolor en el sitio de inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por

27
27

separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, por ejemplo, en un kit, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

[00269] La invención también prevé que una formulación líquida de la presente invención se envase en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del producto de interés. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden estar en un recipiente cerrado herméticamente que indique la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida de la presente invención puede suministrarse en un recipiente cerrado herméticamente con por lo menos 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml de anticuerpo para CXCR5 en una cantidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, por ejemplo.

[00270] Se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz en el diagnóstico, prevención o tratamiento de una afección o enfermedad mediada por CXCR5 y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en o asociada con el recipiente indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección particular. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

[00271] En otro aspecto de la invención, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de CXCR5, por medio de terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable de interés. En una realización de la invención, los ácidos nucleicos producen la proteína codificada en y por células anfitrionas diana que median un efecto terapéutico. De acuerdo con la presente invención puede utilizarse cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles.

[00272] Como revisión general de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et

70
74

al., Clinical Pharmacy 12:488 (1993); Wu et al., Biotherapy 3:87 (1991); Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573 (1993); Mulligan, Science 260:926 (1993); Morgan et al., Ann Rev Biochem 62:191 (1993); y May, TIBTECH 11:155 (1993).

[00273] En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, o fragmentos de unión funcionales del mismo, siendo parte dichas secuencias de ácido nucleico de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras del mismo en un anfitrión adecuado. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y opcionalmente, específico de tejido, así como otras secuencias reguladoras.

[00274] En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada se flanquean por regiones que promueven recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:8932 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435 (1989)). En realizaciones específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; como alternativa, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo. Otros métodos alternativos de integración incluyen el uso de factores de transcripción particulares que reconocen secuencias de ácido nucleico específicas, dedos de cinc y similares.

[00275] La administración de los ácidos nucleicos a un paciente puede realizarse de manera directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o a vectores que llevan el ácido nucleico, o de manera indirecta, en cuyo caso primero se transforman células con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después se trasplantan estas células al paciente.

[00276] En una realización, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo* y es de esperar que produzcan el producto codificado. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyendo secuencias codificantes del anticuerpo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrando dichas secuencias de manera que los vectores sean intracelulares, por ejemplo, por infección utilizando vectores retrovirales atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), por inyección indirecta de ADN desnudo, por medio del uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), utilizando vectores no virales tales como composiciones sintéticas que comprenden un compuesto anfipático que se une al ácido nucleico hidrófilo y tiene la capacidad de fusionarse con las células, conteniendo generalmente de esta manera una parte hidrófoba para combinar con las membranas, por recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, por administración del vector en asociación con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, por administración del vector en asociación con un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu et al.,

23/75

J Biol Chem 262:4429 (1987)) (que puede utilizarse para fijar como objetivo tipos celulares que expresan específicamente los receptores) etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo el ácido nucleico evitar la degradación lisosomal. En otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y la expresión con especificidad de célula, por medio de la dirección a un receptor específico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188 y WO 93/20221).

[00277] En relación con los vectores, por ejemplo, puede utilizarse un vector lentiviral como se conocen en la técnica. Los vectores lentivirales contienen componentes para empaquetar el genoma viral y para la integración en el ADN de la célula anfitriona. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, que facilitan la liberación del gen en un paciente. Por ejemplo, puede utilizarse un vector lentiviral para administrar un transgén a células madre hematopoyéticas. Las referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., J Clin Invest 93:644 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467 (1994); Salmons et al., Human Gene Therapy 4:129 (1993); y Grossman et al., Curr Opin Gen and Dev 3:110 (1993).

[00278] En la presente invención también pueden utilizarse adenovirus. Las dianas para los sistemas de liberación basados en adenovirus son hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo, por ejemplo. Los adenovirus infectan a células que no se están dividiendo, una ventaja con respecto a los vectores retrovirales anteriores. Kozarsky et al., Curr Opin Gen Dev 3:499 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Pueden encontrarse otros casos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld et al., Science 252:431 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143 (1992); Mastrangeli et al., J Clin Invest 91:225 (1993); documento WO94/12649; y Wang et al., Gene Therapy 2:775 (1995).

[00279] También pueden utilizarse en terapia génica virus adenoasociados (AAV) (Walsh et al., Proc Soc Exp Biol Med 204:289 (1993); y las Patentes de Estados Unidos N° 5.436.146; 6,632,670; y 6.642.051.

[00280] Otra estrategia de terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejidos por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Las células después se ponen bajo selección para aislar las células que se han captado y que expresan el gen transferido. Esas células después se administran a un paciente.

[00281] De esta manera, el ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, que incluyen pero sin limitación transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las

secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos etc. En este campo se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células (ver, por ejemplo, Loeffler et al., Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen et al., Meth Enzymol 217:618 (1993); y Cline Pharm Ther 29:69 (1985)) y pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, siempre que no se alteren el desarrollo y las funciones fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe permitir la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico se exprese por la célula, se pueda heredar y se exprese por la descendencia de la célula.

[00282] Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o células progenitoras) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para el uso depende del efecto deseado, el estado del paciente etc., y puede determinarse por un experto.

[00283] Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia génica incluyen cualquier tipo celular disponible deseado e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células progenitoras o células madre hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal etc.

[00284] En una realización, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención se introducen en células de tal manera que el transgén se exprese por las células o su descendencia, y las células recombinantes después se administran *in vivo* para conseguir un efecto terapéutico. En una realización específica se usan células madre o progenitoras. De acuerdo con la realización de la presente invención puede utilizarse cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (ver, por ejemplo, el documento WO 94/08598; Stemple et al., Cell 71:973 (1992); Rheinwald Meth Cell Bio 21A:229 (1980); y Pittelkow et al., Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)). Como CXCR5 se expresa, por ejemplo, en células B, son células anfitrionas adecuadas células sanguíneas y células de médula ósea. Sin embargo, el alcance de la presente invención en relación con el uso de células madre como anfitriones no contempla la preparación y uso de un transgén para obtener un organismo transgénico por medio de la administración del transgén de interés a embriones y células madre embrionarias.

[00285] La invención proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de enfermedades mediadas por CXCR5 o uno o más síntomas de las mismas, por medio de la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de, por ejemplo, una formulación líquida de la invención. El sujeto es preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono, tal como un macaco y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

75
77

[00286] CXCR5 también se expresa en ciertas células neoplásicas, tales como de páncreas, colon y vejiga, así como en leucemias de células T (Qinping et al., *Oncogene* 24:573-584, 2005) y leucemias de células B (Burkel et al., *Blood*, Jul 2007; doi:10.1182/blood-2007-05-089409) y la estimulación de CXCR5 se correlaciona con la proliferación de células de carcinoma, Meijer et al., *Canc Res* 66:9576-9582, 2006.

[00287] De esta manera, el anticuerpo o derivado del mismo de interés puede utilizarse para controlar la proliferación de células neoplásicas que expresan CXCR5, identificándose esos cánceres por medio de la determinación de la presencia de expresión de CXCR5 por medio de un ensayo de diagnóstico enseñado aquí. El anticuerpo de interés puede reducir la infiltración de células malignas, reducir la resistencia a la apoptosis y minimizar la proliferación. A estos pacientes entonces se les administra una cantidad inhibidora de la proliferación de células neoplásicas de un anticuerpo, o derivado del mismo, de interés como el que se proporciona aquí.

[00288] Algunos trastornos autoinmunes están asociados con una expresión aberrante y/o elevada de CXCL13, tales como el lupus (Ishikawa et al., *J Exp Med* 193:1393-1402, 2001) y el síndrome de Sjoren (Salomonsson et al., *Scan J Imm* 55:336-342, 2002; y Barone et al., *Arth Rheum* 52(6):1773-1784, 2005), o con una alta expresión de CXCR5, tales como la miastenia grave (Sims et al., *J Imm* 167:1935-1944, 2001; Saito et al., *J Neuroimm* 55:336-342, 2005; y Tackenberg et al., *Eur J Imm* 37:849-863, 2007). Por lo tanto, un anticuerpo de interés se usa para minimizar el efecto de altos niveles o alta actividad de CXCL13 o ligando de CXCR5. En trastornos autoinmunes caracterizados por altos niveles de células B, altos niveles de CXCR5 o altos niveles de CXCL13, o de otro ligando de CXCR5, se administra una cantidad inhibidora de la actividad de las células B de un anticuerpo de interés como se enseña aquí.

[00289] Se observa una expresión aberrante de CXCR5 en la esclerosis múltiple, *Brain* 129(Pt 1):200-211, 2006.

[00290] En la colitis, CXCR5 tiene una función en la formación y función de GALT (Carlsen et al., *Gut*, 2002, 51(3):364-367). La migración e infiltración mediada por CXCR5 de células B en la lámina propia del intestino, y la infiltración en la mucosa en general, (Mazzucchelli et al., *J Clin Invest*, 1999, 104(10):R49-R54) y su expresión en lesiones de colitis ulcerosa que contienen centros germinales ectópicos, se inhibe por un anticuerpo de interés.

[00291] La reducción de células B tiene un efecto terapéutico beneficioso en la mejora de los síntomas de la artritis reumatoide (Oligino & Dalrymple, *Arth Res Ther* 5(Suppl 4):S7-S11, 2003). CXCR5 se expresa a altos niveles en el tejido sinovial de pacientes con artritis, en comparación con tejidos de individuos que no padecen artritis reumatoide (Schmutz et al., *Arth Res Ther* 7:R217-R229, 2005). De esta manera, el anticuerpo de la presente invención puede prevenir la infiltración y la interacción de las células B en una articulación. Por consiguiente, el tratamiento incluye la administración de una cantidad reductora del nivel de células B de un anticuerpo de interés a un paciente al que se le ha diagnosticado artritis. El anticuerpo puede administrarse localmente a la articulación afectada.

[00292] Se observa neogenia linfoide ectópica en varias afecciones, que incluyen artritis psoriásica (Canete et al., Ann Rheum Dis, Jan 12, 2007, doi:10.1136/ard.2006.062042), enfermedades inflamatorias crónicas, in general (Aloisi & Pujol-Borrell, Nat Rev Imm 6:205-217, 2006) y en injertos que experimentan rechazo, tanto crónicos (Baddoura et al., Am J Trans 5:510-516, 2005) como agudos (DiCarlo et al., Am J Trans 7:201-210, 2007). CXCL13 y CXCR5 estaban presentes en injertos cardíacos (DiCarlo et al., *supra*); y CXCL13 estaba presente en artritis psoriásica (Canete et al., *supra*). La presencia de CXCL13 y/o CXCR5 está asociada con el desarrollo de los folículos linfoides ectópicos con áreas de células B y de células T, como las que se encuentran en ganglios normales. También se asoció la presentación de aloantígenos por células B con el modelo de aloinjerto cardíaco agudo (Noorchashm et al., J Imm 177:7715-7722, 2006).

[00293] De esta manera, un anticuerpo de interés puede utilizarse para impedir la inflamación y el rechazo de injertos. Al paciente entonces se le administra una cantidad inhibidora de la actividad de las células B de un anticuerpo para reducir la inflamación, para minimizar el desarrollo de centros germinales ectópicos, para minimizar el reclutamiento de células B en un injerto y para minimizar la presentación de aloantígenos por células B antes o después de un procedimiento de trasplante.

[00294] La invención ahora se ejemplificará para ayuda del experto por medio de los siguientes ejemplos no limitantes que representan algunas de las realizaciones por medio de y en las cuales puede ponerse en práctica la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: GENERACIÓN DE INMUNÓGENO

[00295] Pueden inducirse anticuerpos monoclonales anti-CXCR5 en células CHO transformadas con ADN que codifica CXCR5 humano de longitud completa y expresarse en la superficie celular ("células r-CXCR5-CHO"). La secuencia de CXCR5 usada para transformar las células puede obtenerse a partir de bases de datos, tales como NM 001716.2, NC000011.8 o NM001716, y sintetizarse o aislarse a partir de una fuente celular adecuada.

[00296] El marco de lectura abierta de CXCR5 se coloca en un vector de expresión, tal como pCDNA3.1neo_DEST, y después este vector se introdujo por transfección en células 300-19 (Immunogen).

[00297] Además, el dominio EC de CXCR5, con la secuencia de aminoácidos MNYPTLEMDLENLEDLFWELDRDLNYNTSLVENHLC (SEC ID N°:1), se conjugó con KLH por la cisteína C terminal, y se utiliza como inmunógeno. Se administraron IP células que expresaban CXCR5 o el dominio EC de CXCR5 (5×10^6 células en 0,2 ml o 50 µg de péptido en 100 µl de amortiguador, opcionalmente mezclado con 100 µl de adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund). Las inyecciones con el antígeno se repiten cada dos semanas hasta que se detecta un alto título de anticuerpo para CXCR5 en el suero, por ejemplo, por FACS utilizando, por ejemplo, células CXCR5⁺ y, por ejemplo, el MAB190 disponible en el mercado (R & D Systems) como control positivo.

29

[00298] Las células que expresaban CXCR5 se mantienen a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) dializado al 10% (Invitrogen). Las células se preparan para la inyección sustituyendo el medio de cultivo anterior por solución salina (sin Ca/Mg) amortiguada con fosfato (CMF-PBS) suplementada con EDTA 5 mM, y recogiendo las células en ese amortiguador. Las células recogidas se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante aproximadamente 5 minutos, se lavan una vez por resuspensión del sedimento en CMF-PBS y centrifugación como se ha indicado anteriormente, se cuentan y se ajustan al volumen apropiado (tal como 5 x 10⁶ células en 0,2 ml) para inyección por resuspensión del sedimento celular en CMF-PBS.

[00299] Como se ha mencionado, la expresión de CXCR5 se controló, por ejemplo, por análisis FACS, utilizando anticuerpos para CXCR5 disponibles en el mercado tales como MAB190 (R & D), clon RF8B2 y 2G8 (2G8 es un anticuerpo de rata anti-CXCR5 de ratón, mientras que los otros anticuerpos adquiridos son anticuerpos anti-CXCR5 humano) (BD), y 2C1 (Abnova), así como diversos anticuerpos policlonales dirigidos a hCXCR5 obtenidos poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica.

[00300] Para facilitar la construcción del plásmido y potenciar la expresión de CXCR5, se generan oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del péptido líder que comprendían los primeros 135 pares de bases de la secuencia de ácido nucleico codificante de CXCR5. Los oligonucleótidos contenían algunos cambios en las posiciones codificantes fluctuantes para reducir el contenido de GC. Todos los cambios en la secuencia nucleótidos fueron silenciosos, es decir, no se obtuvieron cambios en la secuencia de aminoácidos. Después de hibridar los oligonucleótidos entre sí, la secuencia codificante del péptido líder obtenido por ingeniería genética se une al resto de la secuencia codificante por PCR-SOE (Ho et al., Gene 77:51 (1989); y Horton et al., BioTechniques 8:528 (1990)).

[00301] La expresión de CXCR5 se verificó antes del uso como inmunógeno. Las células se cultivan en RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene FBS al 10%, glutamina 0,2 mM y solución de aminoácidos no esenciales 1x y después se siembran aproximadamente 3-5 x 10⁵ células por pozo en un matraz T75 y se cultivan durante aproximadamente 24-48 horas.

[00302] Las células transformadas o transfectadas se cultivan durante aproximadamente dos semanas hasta que las células que no llevaban el plásmido de expresión de CXCR5 se eliminaron por selección con antibiótico. Las células de las líneas estables pueden lisarse y pueden obtenerse proteínas y someterse a análisis de transferencia Western.

[00303] Las células transfectadas estables o transitorias se ensayan con respecto a la expresión de CXCR5 utilizando métodos para detectar la expresión de CXCR5 en la superficie celular, tales como análisis FACS. Como alternativa, las células pueden lisarse y las proteínas estudiarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Las células transfectadas recogidas de las placas de cultivo se lavan una vez con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se resuspenden en agua desionizada, se mezclan con un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x (BioRad, Hercules, CA) y después se calientan a aproximadamente 100°C

durante 10 minutos. La proteína de la membrana se analiza utilizando medio acondicionado mezclado con un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x y calentado a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se separan utilizando SDS-PAGE en un gradiente de 4-12%. Las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA), que se bloquea con leche en polvo sin grasa al 5% en PBST (PBS con 0,05% de TWEEN-20®) durante por lo menos una hora antes de transferir la proteína.

[00304] CXCR5 se detecta incubando la membrana con anticuerpo primario específico para CXCR5 en amortiguador de bloqueo durante por lo menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lava por lo menos tres veces y se añade anticuerpo secundario conjugado con indicador en amortiguador de bloqueo y se incuba durante por lo menos una hora a temperatura ambiente, con agitación. La membrana se lava tres veces en PBST y se revela con, por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente.

EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE mABS ANTI-CXCR5

[00305] Se inmunizan ratones A/J o BALB/cJ, de aproximadamente 4-6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con las células transfectadas con CXCR5-o un péptido de EC. Un grupo de ratones se ceban por vía intraperitoneal el día 0 con una emulsión 1:1 de péptido conjugado con KLH mezclado con adyuvante (CFA), se refuerzan por vía ip el día 20 con los péptidos con IFC (adyuvante incompleto de Freund) y/o células en PBS sin adyuvante, y finalmente se refuerzan por vía intravenosa el día 44 con los péptidos-KLH mezclados en IFC y/o las células en PBS, sin adyuvante. Otro grupo de ratones se ceban por vía ip el día 0, se refuerzan por vía ip los días 15, 39, 53 y 67, y finalmente se refuerzan por vía intravenosa el día 81 (todas las inyecciones con células en PBS, sin adyuvante). En los dos grupos de ratones, cada inyección contenía aproximadamente de 3×10^6 a 2×10^7 células en un volumen de aproximadamente 200 μ l. Como alternativa, se realizan inmunizaciones con péptido y/o células una vez cada dos semanas, 3-6 veces hasta que se obtiene un título deseable de anticuerpo anti-CXCR5, determinado, por ejemplo, por análisis FACS o ELISA.

[00306] Tres días después de la última inyección, los ratones, opcionalmente, se ensayan con respecto al título de anticuerpo anti-CXCR5 en suero, se sacrifican y los bazo se extraen y se colocan en aproximadamente 10 ml de DMEM sin suero (Gibco) en una placa Petri. Los esplenocitos se separan de la cápsula utilizando pinzas y se lavan dos veces en 10 ml de IMDM sin suero (Cellgro, Herndon, VA) a 37°C. Las suspensiones de células de bazo se transfirieron a un tubo de fondo cónico de 15 ml y se dejó que los desechos sedimentaran durante aproximadamente 2-5 minutos. El sobrenadante que contenía los esplenocitos se transfiere a un tubo de fondo cónico de 15 ml y se lava tres veces más con IMDM hasta la fusión. Las células de bazo de ratones pueden juntarse.

[00307] Opcionalmente, se preparó una suspensión de células individuales de 5 ml de células de alimentación de bazo de control a partir de un ratón inmunizado esencialmente como se ha descrito anteriormente para las células de bazo inmunizadas y se coloca en un incubador

(37°C, 5% de CO₂) hasta que se necesita.

[00308] El compañero de fusión para las células de bazo inmunizadas puede ser una línea de células de mieloma no secretora, sensible a hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT), tal como P3X63-AG8.653 o SP2/0 (ATCC, Manassas, VA) o linfoblastos FO_B (ATCC, CRL-1646). Antes de las fusiones, las células linfoides se mantienen en IMDM/FBS al 10% (37°C, 7% de CO₂) asegurando que las células están en fase de crecimiento logarítmica el día de la fusión. Un mecanismo de selección alternativo se basa en el uso de azaserina, que típicamente se añade un día después de la fusión.

[00309] El protocolo de fusión utilizado es un híbrido de los protocolos indicados en Lerner (Yale J Biol Med, 1981, 54(5)387-402) y Gefter et al. (Somatic Cell Genet, 1977, 3(2)231-236). Antes de la fusión, las células de bazo reunidas se lavan tres veces con IMDM sin suero, y se cuentan. Además, inmediatamente antes de la fusión, las células de mieloma en fase logarítmica se lavan tres veces con IMDM sin suero y se cuentan. Las células linfoides se resuspenden en a 1×10^7 células/ml en IMDM sin suero. Para cada fusión, se mezclan $1-1,5 \times 10^8$ células de bazo con $1-3 \times 10^7$ células de mieloma en un tubo de polipropileno de fondo cónico de 50 ml, y las células se lavan una vez con IMDM sin suero. La relación entre células de bazo y células de mieloma fue 5:1. Los tubos se centrifugan a 500 x g durante 10 minutos para sedimentar las células. Después de aspirar los sobrenadantes, los sedimentos se resuspenden suavemente dando unos ligeros golpes en el fondo de los tubos. Después se colocan los tubos en un vaso de precipitados de agua a 37°C. Todas las etapas de fusión posteriores se realizan en ese vaso de precipitados.

[00310] A continuación, se añade lentamente 1 ml de polietilenglicol 1500 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) precalentado a 37°C a cada sedimento de células durante el transcurso de aproximadamente 1 minuto, mientras se agita suavemente el tubo. Las células se incuban en el PEG durante aproximadamente un minuto seguido de la adición de un ml de IMDM sin suero gota a gota a cada sedimento durante el transcurso de 30 segundos, y después se añaden 9 ml de IMDM sin suero a cada sedimento durante el siguiente minuto. Los dos tubos se centrifugan a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y los sobrenadantes se aspiran. El sedimento de células se resuspende en 100 ml de medio de producción de hibridoma completo filtrado (500 ml de IMDM (Cellgro) mezclado con FBS al 10% (SeraCare, Millford, MA), L-glutamina 0,2 mM, solución de aminoácidos no esenciales 1x, piruvato sódico 1 mM, pen-estrep al 0,01% (Invitrogen) y 1X suplemento HT (Invitrogen)).

[00311] Cada 100 ml de suspensión celular se colocan en diez placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos, con un volumen de ~100 µl/pozo. Las placas se mantienen en un incubador a 37°C, 7% de CO₂. El día 2 después de la fusión, las células se seleccionan por la adición de azaserina 5,7 µM en IMDM a las células fusionadas a 100 µl por pozo. Se retiran sobrenadantes para la selección primaria, típicamente los días 10-14 después de la fusión, de los pozos que contenía clones. La eficacia de la fusión fue de 75-99% (720-950 de 960 pozos posibles desarrollaron clones que se someten a selección).

[00312] La selección primaria puede ser un radioinmunoensayo (RIA) diseñado para

80
82

detectar anticuerpos que se unen al CXCR5 humano. Para realizar el RIA, se añade IgG de cabra anti-ratón purificada por afinidad (específica para el fragmento F_c) (Cappell, Cochranville, PA) en PBS a placas de microtitulación de PVC de 96 pozos (50 µl/pozo) y se incuban durante una noche a 4°C. La IgG de cabra anti-ratón se retira de las placas y los pozos se bloquean con 100 µl/pozo de FCS/PBS al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de bloqueo, se añade sobrenadante de cultivo de hibridoma puro a los pozos (50 µl/pozo) y la mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. A continuación, se añaden 50 µl de ¹²⁵I-CXCR5 (~20,000 cpm) en PBS/FCS al 5% a cada pozo y la mezcla se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, los pozos se lavan 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05%. Después de retirar todo el amortiguador de lavado, los pozos se separan cortando las placas y se analizan en un contador gamma. Los pozos a los que se añade FCS/PBS al 5% en lugar de sobrenadante de cultivo sirven como pozos de fondo.

[00313] El CXCR5 purificado se marca con ¹²⁵I de acuerdo con el método de Bolton-Hunter, sustancialmente como se describe por el proveedor del reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA). La calidad del ¹²⁵I-CXCR5 se controla confirmando que el procedimiento de marcaje no destruía los epítomos reconocidos por los anticuerpos para CXCR5 disponibles en el mercado (R & D o Becton Dickinson, Mountain View, CA).

[00314] Los clones se consideran positivos tras la selección primaria si muestras del sobrenadante se marcan aproximadamente 10 veces con respecto al nivel de fondo en el RIA. Los clones positivos se sacan, se expanden y se almacenan en estado congelado.

[00315] Se diseña una selección de hibridoma primaria para determinar si los anticuerpos reconocían epítomos nativos de CXCR5. Esto se consigue por medio de un análisis FACS de CXCR5 de la superficie celular presentado en células CXCR5⁺ teñidas con los anticuerpos monoclonales, y la visualización de la unión con segundo anticuerpo de cabra anti-ratón marcado en forma fluorescente. Los clones se consideran positivos tras la selección primaria si muestras del sobrenadante se marcan aproximadamente 10 veces con respecto al nivel de fondo en el análisis FACS. Además, para localizar los epítomos de CXCR5 unidos a los anticuerpos, se realizan ensayos competitivos con anticuerpos para CXCR5. Se seleccionan clones positivos, se expanden y se almacenan en estado congelado.

EJEMPLO 3: ENSAYOS DE UNIÓN BASADOS EN CÉLULAS PARA mABS ANTI-CXCR5

[00316] Se usó un ensayo de unión basado en células para caracterizar los mAb anti-CXCR5. Por ejemplo, pueden utilizarse las células transfectadas que expresan CXCR5 descritas anteriormente, tales como hCXCR5/Hek293. Se clonó en un vector un marco de lectura abierta de CXCR5 humano de longitud completa, por ejemplo, en pCDNA3.1neo DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA). La región codificante de CXCR5 se sintetiza por RT-PCR utilizando ARN de hígado y de cerebro humano (Ambion, Inc., Austin, TX) como plantilla. La construcción plasmídica final, CXCR5/CDNA3.1neo, expresó una proteína CXCR5 de longitud completa. Se generó una

estirpe celular estable que expresaba CXCR5 por transfección de la construcción plasmídica CXCR5/pCDNA3.1neo en células CHO o Hek293 (N° ATCC CRL-1573) utilizando un kit Lipofectamine 2000 convencional y disponible en el mercado. Después de la transfección, las células se cultivan en DMEM durante una noche, después se vuelven a sembrar en medio con 200 µg/ml de neomicina y se cultivan durante 12-14 días. se recogen colonias individuales aisladas y se cultivan en pozos separados hasta que se amplifican suficientes células para clonación. Se identifican clones estables resistentes a neomicina y que expresaban altos niveles de proteína CXCR5 por análisis FACS utilizando anticuerpos policlonales anti-CXCR5 (R&D Systems, Minneapolis, MN) o anticuerpos policlonales generados a medida.

[00317] También se confirma la expresión de CXCR5 en células HS Sultan humanas (N° ATCC CRL-1484) que expresan CXCR5 de manera natural, por análisis FACS. Se cultivan células HS Sultan en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%, glutamina 0,2 mM y solución de pen/estrep al 0,1% (100 µg/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina).

[00318] La unión de anticuerpo basada en células puede evaluarse utilizando el sistema de detección de células FMAT™ (selección de alto rendimiento macroconfocal con fluorescencia) 8100 HTS o 8200 (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se siembran estirpes celulares que expresan CXCR5 de manera natural o transfectadas de manera estable con construcciones de expresión de CXCR5 en placas de 96 pozos. Como alternativa, se siembran células 293T o CHO transfectadas de manera transitoria en la placa de 96 pozos. Las células se siembran a una densidad de 5.000-30.000 células por pozo. Después de 20-24 horas, se añaden mAb anti-CXCR5 y anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con FMAT conjuntamente a los pozos y se incuba durante 1 h, 2 h, 4 h o durante una noche a temperatura ambiente.

[00319] La unión de anticuerpo basada en células también se evalúa por FACS utilizando una estirpe celular estable Hek293/CXCR5 que expresaba CXCR5. Las células se incuban con mAb anti-CXCR5 en PBS. Después de tres lavados, las células se incuban con anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente (BD Sciences, Palo Alto, CA).

[00320] Los resultados indicaron que varios mAb se unen al CXCR5 expresado en construcciones de plásmido recombinante. Por ejemplo, se ensayan 11D6, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6, 79B7 y 16D7, variantes humanizadas del último anticuerpo, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC1-LC1 y 16D7-HC2-LC1, un anticuerpo de IL13 de control negativo, CA13, controles positivos, MAB190, 2C1 y RF8B2, tres controles de isotipo de ratón para IgG1, IgG2a e IgG2b y un control de isotipo de IgG2b de rata (correspondiente a RF8B2), con respecto a la unión a las células HEK transfectadas para expresar CXCR5. Los anticuerpos de control positivo 2C1 y MAB190 se unieron a las células CXCR5. RF8B2 presentó niveles de unión intermedios. Los anticuerpos de control negativo presentaron sólo unión de fondo. Todos los anticuerpos excepto CA13 se unieron a las células hCXCR5/HEK con perfiles de unión y cinéticas de titulación similares a las del anticuerpo progenitor 16D7 y a las de 79B7.

[00321] También se tiñen células 2993 transfectadas con reactivos de

84

inmunofluorescencia de manera transitoria que contenían un plásmido CXCR5/neo como se ha descrito anteriormente y se observan por microscopía de fluorescencia. Los análisis FACS y FMAT basados en células confirman que los mAb efectivamente se unen al CXCR5 expresado en construcciones plasmídicas recombinantes o como proteína natural en células cultivadas. Se determina una señal de unión positiva basándose en la lectura de señal FMAT que es significativamente mayor que la unión de fondo y otros clones de hibridoma negativos ($p > 0,01$).

[00322] Los mAb para CXCR5 generados, tales como 16D7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6 y 79B7, se unen al dominio EC y bloquean la unión de CXCL13 al CXCR5 en la célula.

EJEMPLO 4: ANÁLISIS DE AFINIDAD BIACORE

[00323] Se sintetiza la región EC N-terminal de CXCR5 (aminoácidos 1-59) de humano y de ratón con un marcador de biotina terminal. Los péptidos sintéticos se inmovilizan en un chip Biacore durante aproximadamente 20 unidades de respuesta (RU). Después, los mAb se exponen al chip para recoger las mediciones cinéticas y para el mapeo del epítipo, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[00324] El clon de mAb de ratón anti-hCXCR5 16D7, tenía un valor calculado de K_D de $2,16^{-12}$ M; el anticuerpo quimérico de IgG4 de ratón/humana 16D7 (regiones VH y VL de 16D7 injertadas en una Fc de IgG4 humana, opcionalmente con codones optimizados, utilizando métodos convencionales tales como clonación, amplificación de extremos, determinación de la masa de las regiones y clonación de las partes) tenía una K_D de $1,41^{-12}$ M; y para las diversas variantes humanizadas de 16D7, donde la estructura de las variantes y la derivación de sus cadenas pesadas y ligeras se denota por los términos, “HC_” para una cadena pesada particular y “LC_” para una cadena ligera particular, donde la composición de las cadenas se proporciona más adelante aquí, 16D7-HC1-LC1 tenía una K_D de $3,11^{-12}$ M; 16D7-HC1-LC2 tenía una K_D de $1,41^{-12}$ M; 16D7-HC2-LC1 tenía una K_D de $2,40^{-12}$ M; 16D7-HC1-LC3 tenía una K_D de $1,21^{-12}$ M; 16D7-HC3-LC4 tenía una K_D de $4,92^{-12}$ M; 16D7-HC3-LC5 tenía una K_D de $1,84^{10}$ M; y 16D7-HC1-LC6 tenía una K_D de $9,17^{-11}$ M.

[00325] SAR113244 humanizado, una forma de la variante 16D7 humanizada, 16D7-HCL-LC3 que lleva la suscripciones S241P y L248E (métodos y reactivos conocidos que practican sustituciones introducidas, utilizando numeración Kabat), se captura en un chip Biacore mediante anticuerpo IgG Fc antihumano de ratón pre-inmovilizado, y luego utilizado en un ensayo Biacore de formato de ensayo inverso en donde las cinéticas de la interacción de péptido de Terminal N CXCR5 humano no marcado (aminoácidos 1-59) con el mAb sobre el chip se determinan. Se determina K_D para el SAR113244 que es de 1.13 ± 0.08 -11M. Se determinan los valores K_D como el ensayo delantero utilizando péptido humano biotinilado inmovilizado en la superficie del chip y SAR113244 como analito, que fueron consistentes con aquellos obtenidos utilizando el ensayo inverso

83
85

EJEMPLO 5: ANÁLISIS DE transferencia Western DE LA ACTIVIDAD DE UNIÓN DE MAB ANTI-CXCR5

[00326] Se realiza transferencia Western para evaluar la actividad de unión de mAb anti-CXCR5 al CXCR5 en condiciones de desnaturalización, así como los niveles de expresión de CXCR5 y otras proteínas relacionadas con CXCR5 en estirpes celulares humanas. También se preparan muestras de proteína a partir de células transfectadas de manera estable utilizando el equipo de reactivo de extracción de proteínas de mamífero M-PER (Pierce, Rockland, IL, N° Cat 78501) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se calientan a 70°C durante 10 minutos después de añadir un volumen igual de amortiguador de carga de muestra de proteína 2x. Todas las muestras se separan por electroforesis en un gel de SDS-PAGE con un gradiente de 4-12%. Las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de PVDF y se aplican mAb anti-CXCR5 a la membrana de transferencia Western como anticuerpo de detección primario. Para la detección se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 680 y las membranas se exploran utilizando el sistema de formación de imágenes por infrarrojos Odyssey (Li-cor, Lincoln, Nebraska) o utilizando electroquimioluminiscencia (ECL). Se generan anticuerpos de control positivo contra CXCR5 humano como se enseña aquí.

EJEMPLO 6: ENSAYO FACS PARA EL CONTROL INTERNALIZACIÓN DE CXCR5

[00327] Se obtienen células de la capa leucocitaria (buffy coat) a partir de voluntarios sanos (Gulf Coast Blood Center, Houston, TX). Se aíslan células mononucleares periféricas (PBMC) humanas con un método de gradiente de Ficoll-Hypaque convencional. Las PBMC se cultivan ($0,5 \times 10^6$ células/pozo) en una placa de 96 pozos a 4°C. Cada pozo contiene 0,2 ml de RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales (10 µg/ml). Después de 30 minutos, el medio se reemplaza por RPMI 1640 nuevo frío suplementado con FBS al 10% y sin anticuerpos. Las células se transfieren a una cámara de cultivo de tejidos humidificada a 37°C que contiene 5% de CO₂. Las células tratadas con anticuerpo monoclonal se recogen inmediatamente, 2 h o 24 h después de transferir las células a 37°C. Las células se lavan una vez con PBS y se incuban en PBS frío que contiene BSA al 1% (PBSB) durante 30 minutos. Las células después se tiñen con anticuerpo anti-CXCR5 humano conjugado con PE (BD Biosciences). Después de 30 minutos, las células se lavan 3 veces con PBSB y se fijan en solución de paraformaldehído al 1% durante una noche. Al día siguiente, se analiza la presencia de CXCR5 con un citómetro de flujo del sistema BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

EJEMPLO 7: ENSAYO FLIPR

[00328] Se miden cambios en el calcio intracelular cultivando 9000 células/pozo e incubando durante una noche. Las células eran de la estirpe RBL-2H3 transfectada de manera estable con CXCR5 humano. Las células después se lavan y se cargan con fluo-4/AM 2 mM

84
86

(Molecular Probes) en un amortiguador que contenía probenecid 2,5 mM. Las células se exponen a mAb para CXCR5 y después se lavan con amortiguador de ensayo. Las células se exponen a CXCL13 10 nM (R & D). Los cambios en el Ca^{+2} intracelular se registran utilizando el dispositivo 384-B FLIPR (Molecular Devices). Como controles se utilizan mAb anti-CXCR5 humanos disponibles en el mercado, e IgG1 e IgG2b de ratón.

[00329] Como se analiza más adelante aquí, se construyeron varias versiones humanizadas de mAb 16D7, tales como CHIMERIC 16D7 (la quimera de hIgG₄), 16D7-HC1-LC1, 16D7-HC1-LC2, 16D7-HC2-LC1, 16D7-HC1-LC3, 16D7-HC3-LC4, 16D7-HC3-LC5 y 16D7-HC1-LC6, y se ensayan con respecto a la actividad biológica como se demuestra por el flujo de calcio.

[00330] Los anticuerpos humanizados, aparte de un control negativo, CA13, demostraron una actividad neutralizadora de señales igual a la del anticuerpo 16D7 progenitor sobre células transfectadas que expresaban de manera estable CXCR5.

EJEMPLO 8: ENSAYO DE QUIMIOTAXIS

[00331] Se añaden células HS Sultan CXCR5⁺ (ATCC CRL1484) a la cámara superior de una placa transwell (Millipore) a $0,5 \times 10^6$ células/pozo en la presencia de CXCL13 100 nM (R & D) o amortiguador CTX (RPMI sin rojo de fenol, que contiene FBS al 1%, BSA al 0,5% y piruvato Na 1 nM) y se evalúa el número de células que migraban a la cámara inferior. Las dos cámaras se ensamblaron y se incuban durante dos horas. Se cuentan las células de la cámara inferior después de añadir reactivo colorimétrico (Promega) y de leer a DO₄₉₀.

[00332] La migración específica de CXCR5 se determina como la diferencia entre el número total de células que habían migrado y el número de células que migraban de manera espontánea. Si se ensaya un anticuerpo anti-CXCR5, las células se incuban con el anticuerpo durante 30 minutos antes de la adición a la cámara superior. El grado de inhibición de anticuerpo es la relación de la migración específica en presencia de anticuerpo con respecto a la cantidad de migración en ausencia de anticuerpo. La relación puede multiplicarse por 100% para producir un porcentaje de inhibición.

[00333] Los anticuerpos del Ejemplo 7 se comparan con el anticuerpo 16D7 progenitor con respecto a la capacidad de neutralizar la quimiotaxis. Todos los anticuerpos humanizados aparte del mAb de control negativo CA13, neutralizaron la quimiotaxis en un perfil comparable al de 16D7 y 79B7, 14C9, 19H5, H28, 54G6, G7, 56H6. R&D MAB190 tenía una actividad intermedia mientras que H28 y el anticuerpo de Abnova 2C1 no neutralizaban completamente la migración de las células inducida por el ligando.

EJEMPLO 9: CÉLULAS B HUMANAS PRIMARIAS

ENSAYO DE REACTIVIDAD

[00334] Se aíslan PBMC humanas a partir de sangre entera utilizando columnas

37
85

Accuspin (Sigma). Después se resuspenden PBMC en amortiguador de tñido BD (Becton Dickinson) a 20 millones de células/ml. Se añade un µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR5 humano a 50 µl de PBMC y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan dos veces con amortiguador BD Stain. Se añaden cincuenta µl del segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE F_(ab) (Beckman Coulter) diluido 1/100, al cóctel de PBMC-anticuerpo y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan tres veces con amortiguador BD Stain. A las células se les añade una mezcla que contenía anticuerpo de ratón anti-CD20 humano-FITC (BD) y CD4-APC (BD) a una dilución 1/50, y éstas después se incuban durante 20 minutos a 4°C para evaluar la especificidad por las células B/T. Las células se lavan 3 veces con amortiguador BD Stain, se resuspenden en 250 µl de amortiguador BD Stain y se someten a un análisis FACS en un FACStar Plus. Como control positivo se utiliza anticuerpo de ratón anti-CXCR5 humano (R&D; mAb190). Se generan curvas de titulación para anticuerpos humanizados y se representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) frente a la concentración.

[00335] Los anticuerpos humanizados del ejemplo 7 se ensayan con respecto a la unión a PBMC humanas.

[00336] Los anticuerpos, aparte del control negativo CA13, se unen y tienen el mismo perfil de titulación sobre células B humanas. El CA13 de control negativo, sólo demuestra una unión de fondo. El clon RF8B2 de BD se une débilmente a PBMC humanas.

EJEMPLO 10: CÉLULAS B DE MACACO

ENSAYO DE REACTIVIDAD

[00337] Se obtiene sangre entera de macaco (cyno) en Bioreclamation, Inc. (Hicksville, NY). La sangre se transporta en tubos de preparación de células (CPT) de BD después de la centrifugación. Las PBMC de cyno contenidas en la capa plasmática se retiran del tubo CPT y se introducen en un tubo de 50 ml que tenía la capa de gel en gradiente sin alterar. El tubo se lava con 5 ml de PBS para extraer completamente todas las células y el lavado se añade a un tubo limpio de 50 ml. Las PBMC de cyno se centrifugan a 1200 RPM durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en 1 ml de amortiguador BD FACS Stain (BD). Se utilizan un millón de células por ensayo. Se añade un µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CXCR5 humano (purificado) a 50 µl de PBMC y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan dos veces con amortiguador BD Stain. Se añaden cincuenta µl de segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-ratón-PE F_(ab) (Beckman Coulter) diluido 1/100 a las células y se permite la unión durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavan tres veces con amortiguador BD Stain. A las células se les añade una mezcla que contiene anticuerpo de ratón anti-CD20 humano-FITC (BD) y CD4-APC (BD) a una dilución 1/20 durante una incubación de 20 minutos a 4°C para evaluar la especificidad por las células B/T. Las células se lavan 3 veces con amortiguador BD Stain, se resuspenden en 250 µl de amortiguador BD Stain y se someten a un análisis FACS en un FACStarPlus. Como control positivo se utiliza el mAb de ratón anti-CXCR5 humano comercial (R&D; MAB190).

[00338] El anticuerpo monoclonal 11D6 de la presente invención reactivo con

CXCR5 humano, se compara con un control de isotipo de IgG, las versiones humanizadas de 16D7 y el MAB190 se ensayan con respecto a la reactividad con CXCR5 cynomolgus. También se ensayó 79B7.

[00339] Se encontraron células positivas para CD20 y CXCR5 con MAB190 y 11D6. Por otra parte, 16D7 y sus variantes humanizadas, así como G7 y RF8B2 de BD y 2C1 de Abnova no se unen a células B de macaco. 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 también se unieron a células B de cynomolgus.

[00340] Los presentes anticuerpos CXCR5 se utilizan para estudiar células sanguíneas periféricas. Las células B expresan CXCR5 en por lo menos un experimento, aproximadamente el 10% de las células T periféricas se encuentran que expresan el CXCR5.

EJEMPLO 11: SECUENCIACIÓN DE mAb ANTI-CXCR5

[00341] Los anticuerpos monoclonales de ratón se isotipifican utilizando un kit de isotipificación disponible en el mercado. Se secuencian las secuencias variables de 16D7 y otros mAb anti-CXCR5. Se aísla el ARN total de aproximadamente 5 millones de células del hibridoma utilizando el equipo Qiagen Qianeasy miniprep siguiendo el protocolo del equipo. Se sintetiza ADNc de la primera cadena utilizando el equipo Superscript de Invitrogen (Cat 11904-018), siguiendo los protocolos del equipo.

[00342] Primero se amplifican las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera utilizando los siguientes cebadores de PCR degenerados y la Taq polimerasa (Roche) basándose en métodos descritos en Wang et al. J Immunol Methods. 233:167-77, 2000.

[00343] Cadena Pesada: Cebador izquierdo:
 1: CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTC (SEC ID N°:2)
 2: CTTCCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (SEC ID N°:3)

[00344] Cadena Pesada: Cebador derecho:
 GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEC ID N°:4)

[00345] Cadena Ligera: Cebador izquierdo:
 GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEC ID N°:5)

[00346] Cadena Ligera: Cebador derecho:
 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (SEC ID N°:6)

[00347] donde R es A o G; N es A, G, T o C; M es A o C; W es A o T; S es G o C; e Y es C o T.

[00348] Los productos de PCR se clonaron en pCR4-TOPO® utilizando el equipo de clonación TOPO TA cloning® (Cat n°: 45-0641) y se secuencian utilizando los cebadores de T3 y T7. Después, las secuencias se comparan por medio del programa Blast frente a la base de datos del banco de genes para deducir las secuencias líder para la clonación de regiones variables completas. Basándose en los resultados del Blast, se eligen los siguientes cebadores (Chardes et al., FEBS Letters 452:386-394, 1999) para una segunda vuelta de amplificación por PCR utilizando la Pfx

polimerasa (Invitrogen).

- [00349] Cadena Pesada:
- [00350] Cebador izquierdo:
CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEC ID N°:7)
- [00351] Cebador derecho:
CGACAAGTCGACTAGCCCTTGACCAGGCATCC (SEC ID N°:8)
- [00352] Cadena Ligera:
- [00353] Cebador izquierdo:
WTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEC ID N°:9)
- [00354] Cebador derecho:
CGACTAGTCGACTGGTGGGAAGATGGATACAG (SEC ID N°:10)

[00355] Los productos de PCR se clonaron en pCR-Blunt II®-TOPO® utilizando el equipo de clonación por PCR Zero Blunt® TOPO® de Invitrogen (Cat 45-0245) y se secuencian utilizando cebadores de T7.

[00356] Una vez secuenciadas las cadenas ligeras y pesadas, los ácidos nucleicos pueden registrarse para optimizar la expresión, por ejemplo, en células anfitrionas humanas.

EJEMPLO 12: TRANSFECTOMAS

[00357] Se cultivan células NS0-eu a una densidad de 1 x 10⁶ células/ml. Las células se mantienen en fase de crecimiento exponencial y el medio se cambia el día previo a la transfección. El día de la transfección, se lavan 40 x 10⁶ células. Después, se añaden 10 µg de ácido nucleico linealizado, tal como ADN de cadena ligera, y 10 µg de, por ejemplo, ADN de cadena pesada linealizado a la suspensión celular (el volumen de ADN total debe ser menor de 50 µl) y el cultivo se incuba en hielo durante 15 min. La mezcla de ADN y células se transfiere a una cubeta enfriada (0,4 cm) y se aplica un pulso eléctrico (750 V y 25 µF). La cubeta se pone en hielo inmediatamente después del pulso eléctrico y se mantiene en hielo durante 10-15 min. Las células se recogen y se cultivan en placas. Las células se incuban en un incubador con 5% de CO₂ durante 12-16 días o hasta que aparecen colonias. El sobrenadante de las colonias de células o de las células cultivadas en cultivo en suspensión se ensaya por ELISA los transfectomas positivos se clonan en medio limpio. para seleccionar adicionalmente los transfectomas positivos, se realiza titulación ELISA o el ensayo Biacore. Los transfectomas expandidos se mantienen en matraces de agitación y se recoge anticuerpo o su derivado del sobrenadante.

EJEMPLO 13: ENSAYOS IN VIVO

[00358] Se ha utilizado la artritis inducida por colágeno (CIA), un modelo bien establecido para RA humana, para demostrar la eficacia de anticuerpos contra TNFα (Williams et al., PNAS 1992, 89:9784-9788), así como proteínas de fusión de CTLA-4 y TNFα (Webb et al., Eur J Immunol. 1996, 26:2320-2328; y Wooley et al., J Immunol. 1993, 151:6602-6607). Se perfiló un anticuerpo monoclonal de rata anti-CXCR5 de ratón, clon 1038, en un modelo de ratón de CIA en

el que ratones DBA/1J se inmunizan y se refuerzan con colágeno de pollo de tipo II. La gravedad de la enfermedad (que se evaluaba visualmente midiendo la hinchazón/inflamación de la pata) se controló dos veces por semana, mientras que en las articulaciones recogidas al final del estudio se evaluaron los cambios en la inflamación, pannus, destrucción del cartilago y erosión ósea. El clon 1038, cuando se administraba en un régimen de dosificación profiláctico, reducía significativamente tanto la gravedad de la enfermedad como la patología de la articulación en comparación con ratones CIA tratados con isotipo (ANOVA de medición repetida, $p < 0,05$).

[00359] Se empleó un modelo agudo de ratón para evaluar la eficacia de 16D7-HC1-LC3 en la quimiotaxis *in vivo*. En resumen, se generan ratones C57/Bl6 (8-16 semanas de edad) que expresaban selectivamente huCXCR5 en inmunocitos, tales como células B, células T y neutrófilos, por métodos transgénicos tradicionales utilizando un promotor de CD11a. El modelo de quimiotaxis *in vivo* es un modelo dirigido por neutrófilos. Tras la administración intraperitoneal de 20 µg de ligando huCXCL13 (R&D), los neutrófilos de ratón que expresaban el receptor huCXCR5 migraron a la cavidad peritoneal en respuesta a un gradiente de huCXCL13. Se utilizan lavados de la cavidad peritoneal para recuperar células 80 minutos después de la administración intraperitoneal de huCXCL13 y se utiliza un análisis fluorocitométrico para cuantificar el número de neutrófilos que expresaban huCXCR5 en muestras de 2 ml de lavados peritoneales que migraban específicamente a la cavidad peritoneal en respuesta a la instilación de huCXCL13. Los neutrófilos se identifican por marcadores fenotípicos, tales como Ly6G, CD19 y CD11b. La administración subcutánea de anti-hCXCR5 humanizado, 16D7-HC1LC3, a dos dosis diferentes (7,5 µg o 15 µg) 24 horas antes de la instilación de huCXCL13 mostró eficacia en la reducción de la migración de neutrófilos que expresaban huCXCR5 a la cavidad peritoneal en respuesta a huCXCL13 en comparación con un control tratado con isotipo, mostrando las dos muestras tratadas con anticuerpo de CXCR5 niveles de neutrófilos que esencialmente no son estadísticamente diferentes en comparación con el nivel de neutrófilos de control negativo de isotipo. A 1,5 µg, el anticuerpo para CXCR5 humanizado mostró un bajo nivel de inhibición de migración de neutrófilos en comparación con las dosis mayores de anticuerpo para CXCR5 ensayado.

EJEMPLO 14: RECUBRIMIENTO

[00360] La técnica de recubrimiento del clon 16D7 murino siguió las etapas descritas en in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:969 y en la Patente de Estados Unidos 5.639.641.

[00361] Las secuencias de V_L y V_H de 16D7 se comparan por el programa Blast frente al Protein Data Bank (Nucleic Acids Research, 28:235-242 (2000) o se puede acceder al Protein Data Bank (PDB) por internet, que contiene las coordenadas 3D de macromoléculas biológicas, y se recuperaron las diez secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera más similares a la de 16D7. Para identificar las secuencias se usan los códigos de identificación PDB.

[00362] Los diez homólogos más parecidos para la cadena ligera variable fueron 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), 1AE6 (Proteins 29:161-171, 1997), 1QYG (Pozharski et al.,

“Carving a Binding Site: Structural Study of an Anti-Cocaine Antibody” en “Complex with Three Cocaine Analogs”), 1UZG (J Virol 79:1223, 2005), 1UB5 (Beuscher et al., “Structure and Dynamics of Blue Fluorescent Antibody 19G2 at Blue and Violet Fluorescent Temperatures”), 1RUR (Proc Natl Acad Sci USA 110:2247-2252, 2004), 1FPT (Nat Struct Biol 2:232-243, 1995), 1QFU (Nat Struct Biol 6:530-534, 1999), 1NAK (Virology 315:159-173, 2003) y 1CGS (J Mol Biol 236:247-274, 1994) (se retiran las secuencias redundantes) y los diez homólogos más parecidos para la cadena pesada variable son 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000), 1OAK (Nat Struct Biol 5:189-194, 1998), 1VFB (Proc Natl Acad Sci 91:1089-1093, 1994), 1CIC Nature 348:254-257, 1990), 1GIG (Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50:768-777, 1994), 1T4K (J Mol Biol 343:1269-1280, 2004), 1A7P (Marks et al.), 1FE8 (J Biol Chem 276:9985-9991, 2001), 1DL7 (J Exp Med 191:2101-2112, 2000) y 1YY8 (Cancer Cell 7:301-311, 2005). Los homólogos más parecidos para las cadenas ligera y pesada fueron 1MJU y 1FNS, respectivamente. Estas dos secuencias se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a minimización de energía por una minimización en gradiente de conjugado de posiciones de coordenadas atómicas con el campo de fuerzas CHARMM22 (J Comput Chem (1983) 4, 187; J Comput Chem (1986) 7, 591) como se aplica en la serie MOE (Chemical Computing Group, Quebec, CA). El modelo se utiliza para localizar las regiones CDR y los residuos de estructura. Se calculó la accesibilidad al disolvente para cada resto de región variable de los diez homólogos más parecidos para cada región variable de anticuerpo y se promedia en una hoja de cálculo Excel como se aplica en un protocolo Scitegic (Hill & Lewicki (2006) Statistics: Methods and Applications, Statsoft, Tulsa, OK). Las posiciones con más de 30% de accesibilidad media se consideran residuos de la superficie. También se consideran las posiciones con accesibilidades medias comprendidas entre 25% y 30% dependiendo de la proximidad a los bucles de CDR.

[00363] Las posiciones de superficie de la región variable del 16D7 murino se comparan con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpo humano. Sólo se conservan para la búsqueda los residuos que presentaron un área de superficie accesible mayor de 30%, con unos pocos residuos que presentaban un área de superficie accesible mayor de 25% y que eran residuos de estructura expuestos al disolvente. Se incluyeron algunos residuos conservados en todas las secuencias de inmunoglobulina para mejorar la convergencia de la búsqueda. Para el análisis de aciertos sólo se retienen secuencias de la línea germinal. Se eligió la superficie de región variable de anticuerpo humano con los residuos de superficie más parecidos, dando una consideración especial a posiciones que están a una distancia menor o igual a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar los residuos de superficie de región variable del anticuerpo de murino 16D7.

[00364] Ninguna de las secuencias contiene ningún epítipo conocido de células B o células T indicado en la base de datos Immune Epitope (IEDB, Immune Epitope Database and Analysis Resource web site; PLoS Biol. 2005;3(3):e91).

[00365] Las secuencias originales de los dominios variables de 16D7 murino son:

[00366] la cadena ligera (las CDR están subrayadas):

[00367] DIVMTQAAPSVAVTPRESVSISCRSSKSLHSSGKTYLYWFLQRPQQ
SPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP
YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:11); y

[00368] la cadena pesada (las CDR están subrayadas)

[00369] QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLIDYGVNWIRQPPGKGLEW
LGVIWGDGTTYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFL
KMNSLQTDDTAMYYCARIVYWGQGLVTVSA (SEC ID N°:12).

[00370] La serie retenida de residuos de superficie para la búsqueda de la cadena ligera incluía D1, V3, A7, P9, P15, R16, E17, S18, P45, G46, Q47, D65, R79, R82, E86, K108, E110 y K112.

[00371] La consulta para la cadena ligera contiene la serie de residuos de superficie definida anteriormente y los aminoácidos conservados C23, W40, Q43, Y91, C93, F103, G104, G106 y T107, que se incluyeron para la convergencia del protocolo BLAST. Todos los demás aminoácidos podrían ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. La búsqueda BLAST se realiza frente a la base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana recopilada por el IMGT (International Immunogenetics Information Systems website, Molec Immunol, 2004, 40:647-659). Se encontró la mejor puntuación de correspondencia en X72482 (protein_id=CAA51150.1) de la que se obtiene la cadena ligera, LC4. LC5 y LC6 son dos variantes de VL4 (VL significa ligera variable) que se ha sugerido que corrigen residuos problemáticos potenciales en la cadena ligera: 1 metionina expuesta (M51) que se mutará a Leu (LC5 & LC6) y 1 posible sitio de desamidación (LC6) en el que la asparagina N53 se cambia por un residuo de serina. En total, se proponen 3 versiones para la cadena ligera variable que contienen entre 4 y 6 mutaciones en comparación con el clon murino progenitor 16D7. Las mutaciones correspondientes se proporcionan en la siguiente Tabla 1. Se proporcionan la numeración secuencial y la numeración de Kabat.

[00372] La serie retenida de residuos de superficie para la cadena pesada variable incluía Q1, Q3, K5, S7, P9, L11, S15, Q16, S20, P41, G42, K43, S61, A62, K64, S65, R70, S74, Q75, Q86, T87, D88, Q103, L106, A111, A112 y K113 (numeración secuencial). Los aminoácidos invariables que se incluyeron en la incógnita de BLAST para la convergencia de la búsqueda fueron: C22, W36, I37, Q39, D89, Y93, C95, W101, G102, G104 y T105. La búsqueda BLAST se realiza frente a la base de datos de secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana recopilada por IMGT. Se retiene una versión para la cadena pesada (HC3). Los dos dominios de V_H de AF062266 (protein_id=AAC18304.1) y AY393082 (protein_id=AAS86018.1), que mostraron la mejor puntuación de correspondencia para la serie de residuos de superficie, presentan una puntuación de similitud equivalente y presentan residuos de superficie idénticos. Por consiguiente, sólo se retiene una sola secuencia para la cadena pesada con diez mutaciones. No se retienen las secuencias de menor puntuación que tienen diferentes residuos de superficie porque tienen menos residuos polares, lo que sugiere una posible solubilidad reducida.

TABLA 1

91/93

Cadena Ligera (numeración secuencial)	Cadena Ligera (numeración de Kabat)	Versión 5 (LC4)	Versión 6 (LC5)	Versión 7 (LC6)
Ala7	Ala7	Ser	Ser	Ser
Pro9	Pro9	Leu	Leu	Leu
Arg16	Arg16	Gly	Gly	Gly
Met56	Met51	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn53	Asn	Asn	Ser
Arg82	Arg77	Lys	Lys	Lys
En total para VL		4 mutaciones	5 mutaciones	6 mutaciones
Cadena Pesada (numeración secuencial)	Cadena Pesada (numeración de Kabat)	(HC3)	(HC3)	(HC3)
Lys5	Lys5	Gln	Gln	Gln
Gln16	Gln16	Glu	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys
Gln86	Gln83	Thr	Thr	Thr
Thr87	Thr84	Ala	Ala	Ala
Asp88	Asp85	Ala	Ala	Ala
Ala111	Ala113	Ser	Ser	Ser
En total para VH		10 mutaciones	10 mutaciones	10 mutaciones

[00373] Se proponen tres versiones para la cadena ligera (LC4, LC5 and LC6). Las mutaciones individuales introducidas por la técnica de recubrimiento de las cadenas ligeras se indican en letra minúscula y están subrayadas y las CDR están subrayadas. Las secuencias sometidas a recubrimiento de las regiones variables se presentan a continuación, no se incluye el dominio constante (IgG4).

LC4:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLl HSSGKTYLYW FLQRPGQSPQ
LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE
IK (SEC ID N°:13)

LC5:

94
92

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPQGSPQ
LLIYRlSnLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE
IK (SEC ID N°:14)

LC6:

DIVMTQsAlS VAVTPgESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW FLQRPQGSPQ
LLIYRlSnLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLkI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE
IK (SEC ID N°:15)

[00374] Se propuso una versión para la cadena pesada (VH3) (VH significa pesada variable). Las mutaciones introducidas por medio de la técnica de recubrimiento de la cadena variable están en minúsculas y subrayadas, y las CDR están subrayadas. No se incluye la secuencia del dominio constante.

HC3:

QVQLqESGPG LVAPSeSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV
IWGDGTTYYN psLKSRLSIs KDNSksQVFL KMNSLtaaDT AMYYCARIVY WQGTLVTVS
s (SEC ID N°:16)

[00375] Se generan secuencias de nucleótidos por OE-PCR y se clonaron en sitios NheI/HindIII del vector de expresión episomal pXL4214 (Durocher et al., NAR, 2002, 30(2), E9. Las secuencias tiene los codones optimizados para la expresión en células humanas. V_L se fusionó a IGKC (AAH93097). V_H se fusionó a IGHG4 (AAH25985), que carecía de la Lys C-terminal (IGHG4ΔK). Las secuencias se validaron por secuenciación de doble cadena

LC4:

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSI SCRSSKSLLHSSGKTYLYWFL
QRPQGSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:17)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGCCACCGCCACCGGCGTG
ACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCA
TCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCTG
AGCGCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCG
ACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGAGGCCGAGG
ACGTGGGCGTGTTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGC

43/45

TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGT
GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACTCCCTGTCTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGT
GCTGAAGCTT (SEC ID N°:18)

LC5:

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSI SCRSSKSL LHSSGKTYLYWFL
QRPQQSPQLLIYRLSNLASGVPDRFSGSGSTAFTLKISRVEAEDVGVIYCMQHLEYPYTFGGGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:19)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTTCCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
ACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCA
TCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGC
AGCGCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCC
ACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGAGAGCCGAGG
ACGTGGGCGTGTA TACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGT
GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACTCCCTGTCTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGT
GCTGAAGCTT (SEC ID N°:20)

LC6:

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSALSVAVTPGESVSI SCRSSKSL LHSSGKTYLYWFL
QRPQQSPQLLIYRLSSLASGVPDRFSGSGSTAFTLKISRVEAEDVGVIYCMQHLEYPYTFGGGTK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:21)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTTCCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
ACAGCGACATCGTGATGACCCAGAGCGCCCTCAGCGTGGCCGTGACCCCCGGCGAGAGCGTGAGCA
TCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGC
AGCGCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCCTGAGCAGCCTGGCCAGCGGCGTGCCCC
ACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGAGAGCCGAGG
ACGTGGGCGTGTA TACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGC

96

TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGT
GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACTCCCTGTCTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
ACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGT
GCTGAAGCTT (SEC ID N°:22)

HC3:

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVAPSESLITCTVSGFSLIDYGVNWIRQPPG
KGLEWLGVIWGDGTTYYNPSLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLTAADTAMYICARIVYWQGTLT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
(SEC ID N°:23)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCCCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGC
ACAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGGCCCCAGCGAGAGCCTGAGCATCA
CCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGACGGCACCACTACTACAACCCAGCCTGAAGA
GCCGCTGAGCATCTCCAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACAGCCTGACCG
CCGCCGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCG
TGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCG
AGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTCTGGA
ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACT
CCCTGTCTCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGG
ACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTT
CCTGCCCTGCCCCCTGAGTTCTTGGGCGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCTAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCTG
AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGG
AGCAGTTCAATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG
GCAAAGAATACAAGTGTAAAGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCTGCT
CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAA
GCTT (SEC ID N°:24)

93
68

EJEMPLO 15: HUMANIZACIÓN

[00376] Las secuencias de V_L y V_H de 16D7 se someten a una búsqueda Blast y los homólogos más parecidos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con puntuaciones de similitud equivalentes. 1MJU se retiene como plantilla debido a la alta precisión de la estructura cristalina, que se había determinado a una resolución de 1,22 Å. Se descubrió que el homólogo más parecido para la cadena pesada era 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884, 2000). Las estructuras 1MJU y 1FNS se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que posteriormente se sometió a minimización de la energía utilizando procedimientos convencionales. Posteriormente se realiza un cálculo de dinámica molecular (MD) de un modelo de homología 3D de 16D7 durante 1,7 nanosegundos en disolvente implícito Generalized Born (véase Gallicchio & Levy, J Comput Chem 2004, 25:479-499).

[00377] La MD empieza con la inicialización de las velocidades desde una distribución gaussiana a 298,15° K, seguido de un periodo de equilibrio de 300 ps. Durante la MD, todos los enlaces se restringen utilizando el algoritmo SHAKE (véase Barth. et al., J Comp Chem, 1995, 16:1192-1209), el paso de tiempo fue de 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración de Verlet, se realiza en el conjunto NVT canónico (número de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 298,15°K. Durante el periodo de producción, se almacenan 1.700 fotos, una cada 1 ps. Las 1.700 conformaciones del anticuerpo de murino constituyen el conjunto sobre el cual se realiza el siguiente análisis para identificar los residuos más flexibles. Para codificar el siguiente análisis se utiliza el Scientific Vector Language (SVL), disponible dentro del entorno de modelado molecular MOE (Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada). En primer lugar, cada foto, N, se superpuso de manera óptima sobre su predecesor, la foto N-1, para controlar los movimientos rotacionales y traslacionales globales que se producen durante el modelado MD y el cálculo. La superposición se obtiene minimizando la distancia de desviación media cuadrática (Root Mean Square Distance) (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos fotos. En el ejercicio de superposición sólo se consideran los átomos pesados de la cadena principal de anticuerpo. utilizando el mismo método de superposición, cada foto se superpuso después sobre la foto medoid. La foto medoid es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más parecidas a las coordenadas promediadas de todas las conformaciones.

[00378] para cada resto de anticuerpo i, se calcularon las RMSD entre los átomos pesados de la conformación j y una conformación k de referencia medoid. La RMSD tiene la

siguiente fórmula: $RMSD_j = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^m (d_{lk})^2}{m}}$, definiéndose d_{lk} como la distancia euclídea expresada en

Angstroms (Å) entre el átomo pesado l del resto j y su homólogo de la conformación k de referencia medoid. Para la asociación por parejas de los átomos pesados l, también se consideró la simetría de los átomos pesados de la cadena lateral para los aminoácidos, Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr.

la conformación k de referencia varía de un resto a otro, y corresponde a la conformación k medoid con la distancia euclídea más próxima a las coordenadas medias de todas las conformaciones del resto estudiado i. Entonces, para cada resto i, se obtiene una distribución de 1.700 valores de RMSD, que refleja la variación de coordenadas del resto i en el transcurso de la MD. Por medio de la agregación de todos los valores de RMSD de todos los residuos del anticuerpo estudiado, se obtiene una distribución global de todas las RMSD. La distribución global de todas las RMSD después se utiliza como distribución de referencia. Cuando el resto i era muy flexible, se realizaba un ensayo estadístico para decidir si la RMSD media observada del resto i, m_i , era significativamente mayor que la RMSD media global para todos los residuos, m_g . Como la muestra es grande, por ejemplo, 1.700 para el análisis del clon 16D7, se utiliza un ensayo Z unilateral (véase Dorofeev & Grant, "Statistics for real-life sample surveys. Non-simple-random samples and weighted data" 2006. Cambridge University Press) siendo la hipótesis nula H_0 que "el valor de m_i observado es menor que el valor de m_g global" para calcular el parámetro estadístico Z_i de acuerdo con la fórmula: $Z_i = \frac{(m_i - m_{global})}{\sqrt{\frac{sd_i}{n}}}$, donde m_i es la RMSD media calculada a partir de la distribución

de RMSD del resto i, m_g es la RMSD media calculada a partir de la distribución de RMSD global, sd_i es la desviación típica calculada a partir de la distribución de RMSD del resto i y n es el tamaño de la muestra, es decir $n=1.700$ para el análisis del clon 16D7. El Z_i calculado después se compara con las probabilidades acumulativas de la distribución normal estándar para evaluar un nivel de significado de 99,9% de la hipótesis alternativa, es decir, que "el valor de m_i observado es mayor que el valor de m_g global". esto correspondía a un $Z_i \geq 3,08$. El parámetro estadístico Z_i , que puede considerarse una puntuación de la flexibilidad, no está correlacionado ni con el peso molecular ni con el número de átomos pesados del resto de anticuerpo ($r^2=0,014$ y $0,0009$, respectivamente cuando se analiza la MD del modelo de 16D7 anti-CXCR5).

[00379] La serie de residuos flexibles para la cadena ligera incluye los siguientes residuos (numeración secuencial): D1, T14, P15, R16, E17, Q47, D65, S72 R79, R82, E86, K108, E110 y K112; y para la cadena pesada incluyen los siguientes residuos: Q1, V2, Q3, L11, S15, Q16, S61, A62, K64, S65, R70, D72, Q75, K81, M82, N83, Q86, Q103, S110, A111, A112 y K113. Las partes flexibles de 16D7 se comparan con las posiciones correspondientes de las secuencias de anticuerpo humano en la versión de septiembre de 2005 de la página web ImMunoGeneTics Database.

[00380] Se retienen para la búsqueda los residuos que presentan una puntuación de alta flexibilidad significativa y unos pocos residuos de estructura que conservan las estructuras 3D de los residuos flexibles.

[00381] Se eligió la región variable de anticuerpo humano con los residuos flexibles más parecidos, dando una consideración especial a posiciones que están a una distancia menor o igual a 5,0 Å de una CDR, para reemplazar los residuos flexibles de región variable del anticuerpo murino 16D7. Las secuencias humanizadas resultantes se someten a una búsqueda Blast de similitud de secuencia en la base de datos UniProtKB/SwissProt confirmando que se habían hecho

suposiciones razonables. Todas las secuencias mostraron un alto grado de similitud con varios anticuerpos humanos. Además, ninguna de las secuencias contiene ningún epítipo de células B o de células T indicado en la base de datos IEDB.

[00382] La mejor correspondencia de secuencia en la IEDB para la cadena ligera (LC1, LC2 and LC3) fue KPGQPPRLLIYDASNRATGIPA (SEC ID N°:25), que incluye la CDR2 pero tiene una diferencia de residuos significativa tipificada por una identidad de secuencia de 56% obtenida a partir de una búsqueda BLAST dentro de la base de datos IEDB.

[00383] La mejor correspondencia en la IEDB para la cadena pesada (HC1 y HC2) fue TDDTAMYYCARI (SEC ID N°:26) que está localizada antes de inicio de la CDR3. La secuencia presenta una identidad de secuencia de 61% con el péptido SEDSALYYCARD (SEC ID N°:27), lo cual hace que sea poco probable que sea un epítipo de célula T humana (J Exp Med (1995) 181, 1540)

[00384] Las secuencias originales de los dominios variables de 16D7 murino son:

[00385] cadena ligera (CDR subrayadas):

[00386] DIVMTQAAPS VAVTPRESVS ISCRSSKSLL HSSGKTYLYW
FLQRPGQSPQ LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVG
YYCMQHLEYP YTFGGGTKLE IK (SEC ID N°:28); y

[00387] cadena pesada (CDR subrayadas):

[00388] QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP
PGKGLEWLGV IWGDGTTYYN SALKSRLSIR KDNSQSQVFL KMNSLQTDDT
AMYYCARIVY WGQGTTLVTVS A (SEC ID N°:29).

[00389] Se sugirieron dos versiones para la cadena pesada (HC1 & HC2) y tres versiones para la cadena ligera (LC1, LC2 and LC3). Las dos versiones de la cadena pesada proceden de AF262096/AAF79987 y AB063657/BAC01285.1, respectivamente. Las dos secuencias presentan una puntuación de similitud equivalente, pero se mantienen porque las series de residuos a mutar parecen ser relativamente diferentes y presentan diferentes propiedades fisicoquímicas. La secuencia de LC1 procede de BAC01682/AB064054.1 y sólo hay dos residuos a mutar. LC2 y LC3 son variantes de LC1 que se sugiere que solucionan posibles residuos problemáticos en la cadena ligera: una metionina expuesta (M51) mutada a Leu (versiones 3 y 4) y un posible sitio de desamidación (versión 4) en el que la asparagina, N53, se cambia por un resto de serina. No se retienen todas las combinaciones, sino que cuatro cubren la mayoría de los puntos clave a tratar. Se usa la numeración de Kabat.

Tabla 2

Cadena Ligera (numeración secuencial)	Cadena Ligera (numeración de Kabat)	Versión 1 (LC1)	Versión 2 (LC1)	Versión 3 (LC2)	Versión 4 (LC3)
Arg16	Arg16	Gly	Gly	Gly	Gly
Glu17	Glu17	Ala	Ala	Ala	Ala

98
100

Cadena Ligera (numeración n secuencial)	Cadena Ligera (numeración de Kabat)	Versión 1 (LC1)	Versión 2 (LC1)	Versión 3 (LC2)	Versión 4 (LC3)
Met56	Met51	Met	Met	Leu	Leu
Asn58	Asn53	Asn	Asn	Asn	Ser
	En total para VL	2 mutaciones	2 mutaciones	3 mutaciones	4 mutaciones
Cadena Pesada	Cadena Pesada	(HC1)	(HC2)	(HC1)	(HC1)
Gln1	Gln1	Gln	Glu	Gln	Gln
Ser15	Ser15	Ser	Gly	Ser	Ser
Gln16	Gln16	Glu	Gly	Glu	Glu
Ser61	Ser61	Pro	Ala	Pro	Pro
Ala62	Ala62	Ser	Pro	Ser	Ser
Ser65	Ser65	Ser	Gly	Ser	Ser
Arg70	Arg70	Ser	Ser	Ser	Ser
Gln75	Gln75	Lys	Lys	Lys	Lys
Lys81	Lys81	Lys	Gln	Lys	Lys
Met82	Met82	Val	Met	Val	Val
Asn83	Asn82A	Thr	Asn	Thr	Thr
Gln86	Gln83	Thr	Lys	Thr	Thr
Ala111	Ala113	Ala	Ser	Ala	Ala
	En total para VH	8 mutaciones	11 mutaciones	8 mutaciones	8 mutaciones

[00390] Las mutaciones introducidas por medio de humanización de las cadenas variables están en minúsculas y subrayadas, y las CDR están subrayadas. No se incluyen los dominios constantes.

LC1:

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSL L HSSGKTYLYW FLQRPQGSPQ
LLIYRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGGTKLE
IK (SEC ID N°:30)

LC2:

99
101

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSL LHSSGKTYLYW FLQRPQGSPQ
LLIYRLSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGKLE
IK (SEC ID N°:31)

LC3:

DIVMTQAAPS VAVTPgaSVS ISCRSSKSL LHSSGKTYLYW FLQRPQGSPQ
LLIYRLSsLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP YTFGGGKLE
IK (SEC ID N°:32)

HC1:

QVQLKESGPG LVAPSeSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV
IWGDGTTYYN psLKSRLSIs KDNSkSQVFL KvtSLtTDDT AMYYCARIVY
WGQGLVTVS A (SEC ID N°:33)

HC2:

eVQLKESGPG LVAPggSLSI TCTVSGFSLI DYGVNWIRQP PGKGLEWLGV
IWGDGTTYYN apLKgRLSIs KDNSkSQVFL qMNSLkTDDT AMYYCARIVY
WGQGLVTVS s (SEC ID N°:34)

[00391] Las secuencias de las construcciones quiméricas son las siguientes:

Secuencia de LC Quimérica

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPRESVSI SCRSSKSL LHSSGKTYLYWFL
QRPQGSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGK
LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°:35)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTG
ACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGCGTGCCGTGACCCCCGCGAGAGCGTGAGCA
TCAGCTGCCGCGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCAAGACCTACCTGTACTGGTTCCTGC
AGCGCCCCGGCCAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCC
ACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGAGGCCGAGG
ACGTGGGCGTGACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGT
GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT

102
100

ACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGT
GCTGAAGCTT (SEC ID N°:36)

Secuencia de HC Quimérica

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLIDYGVNWIR
QPPGKGLEWLGVWGDGTTYNSALKSRLSIRKDNSQSQVFLKMNSLQTTDDTAMYYCARI
VYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPSPSCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEC ID N°:37)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCCACC
GGCGTGACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGGCCCCCAGCC
AGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCGACTACGGCGTGAA
CTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGAC
GGCACCACTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCCGCAAGGACAACA
GCCAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATGTA
CTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCC
AGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGTC
CACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTT
GGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCC
GGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCTTCCCTCCTCCCTGGGCACCAAGAC
CTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAG
TCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCTGGGCGGACCTAG
CGTGTTCTGTTCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAA
TTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA
AAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCAG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTT
CCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACA
AGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:38)

101
103

Secuencias de VL Humanizadas

LC1:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLHSSGKTYL
YWFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEY
PYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEC ID N°:39)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGCCACCGCCACC
GGCGTGACACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGTGACCCCCG
GCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCA
AGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTAC
CGCATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
CCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG
CATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
CGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTC
CGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGC
AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCA
GGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACT
ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGT
GACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:40)

LC2:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLHSSGKTYL
YWFLQRPQGQSPQLLIYRLSNLAGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEY
PYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEC ID N°:41)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGCCACCGCCACC
GGCGTGACACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCCAGCGTGGCCGTGACCCCCG
GCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCA
AGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTAC
CGCCTGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
CCGCCTTCACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG
CATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
CGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTC

CGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGC
AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCA
GGA CTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACT
ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGT
GACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:42)

LC3:

MGWSCILFLVATATGVHSDIVMTQAAPSVAVTPGASVSISCRSSKSLHSSGKTYL
YWFLQRPQGQSPQLLIYRLSSLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEY
PYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEC ID N°:43)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCCACC
GGCGTGACACAGCGACATCGTGATGACCCAGGCCGCCCCAGCGTGGCCGTGACCCCCG
GCGCCAGCGTGAGCATCAGCTGCCGCAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAGCGGCA
AGACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGCCCCGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTAC
CGCCTGAGCAGCCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCA
CCGCCTTACCCTGCGCATCAGCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG
CATGCAGCACCTGGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
CGTACGGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTC
CGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAGGCCAAGGTGC
AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCA
GGA CTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACT
ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGT
GACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCTT (SEC ID N°:44)

Secuencias de VH Humanizadas

HC1:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLKESGPGLVAPSELSITCTVSGFSLIDYGVNWIR
QPPGKGLEWLGVIWGDGTTYNP SLKSRLSISKDNSKSQVFLKVTSLTDDTAMYYCARIV
YWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPSCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEC ID N°:45)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCCACC
GGCGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGGCCCCCAGC
GAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCGACTACGGCGTGA
ACTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGA
CGGCACCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGAGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAAC
AGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGGTGACCAGCCTGACCACCGACGACACCGCCATGT
ACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGC
CAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGT
CCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTC
TGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTC
CGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCTTCCCTCCTCCCTGGGCACCAAGA
CCTACACCTGTAACTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGA
GTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCCTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTA
GCGTGTTCTGTTCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCA
ATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC
AAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCA
GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCT
TCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCA
CCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGAC
AAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:46)

HC2:

MGWSCILFLVATATGVHSEVQLKESGPLVAPGGSLSITCTVSGFSLIDYGVNWIR
QPPGKGLEWLGVWGDGTTYYNAPLKGRLSISKDNSKSQVFLQMNSLKTDDTAMYYCARI
VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEC ID N°:47)

GCTAGCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCCACC
GGCGTGCACAGCGAGGTGCAGCTGAAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGGCCCCCGGC

GGCAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTGATCGACTACGGCGTGA
 ACTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCGA
 CGGCACCACCTACTACAACGCCCCCTGAAGGGCCGCCTGAGCATCAGCAAGGACAAC
 AGCAAGAGCCAGGTGTTCTCTGCAGATGAACAGCCTGAAGACCGACGACACCGCCATGT
 ACTACTGCGCCCGCATCGTGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGC
 CAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCGAGT
 CCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCC
 TGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTC
 CGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCTCCCTGGGCACCAAGA
 CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGGA
 GTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTTCCCTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGACCTA
 GCGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAG
 GTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGT
 ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCA
 ATTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC
 AAAGAATACAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCCA
 GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCT
 TCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCA
 CCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGAC
 AAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTTCCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC
 ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCTGAAGCTT (SEC ID N°:48)

EJEMPLO 16:

HUMANIZACIÓN BASADA EN TRAYECTORIAS DINÁMICAS MOLECULARES

[00392] Se hace búsqueda en la base de datos blasted de las secuencias de las secuencias VC y VH del 16D7 en la base de datos de proteínas (PDB) (Berman et al, Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242) y los homólogos más cercanos para la cadena ligera variable son 1MH5, 1MJJ y 1MJU (J Mol Biol 332:423-435, 2003), con clasificaciones de similitud equivalentes. El 1MJU se retiene como plantilla de vida se adapta a exactitud en la estructura de cristal, que se ha determinado hasta una resolución de 1.22Å. El homólogo más cercano para la cadena pesada se encuentra que es el 1FNS (Nat Struct Biol 7:881-884,2000). Las estructuras, 1MJU y 1FNS, se utilizan para construir un modelo de homología de los dominios variables que tiene energía minimizada posteriormente utilizando procedimiento estándar.

[00393] Se desarrolla posteriormente una simulación dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D del 16D7 para 1.1 nanosegundos (ns) en disolvente implícito Nacido Generalizado (ver GalJicchio & Lev)', J Comput Chem 20(H, 25:479-499).La simulación MD empieza por la inicialización de las velocidades a partir de una distribución Gaussiana a 500K,

105
107

seguido por un periodo de equilibrio de 200 picos segundo (ps). Durante la simulación MD, se restringen todos los enlaces utilizando el algoritmo SHAKE (ver Bmth. et al., J COUlp Chem, 1995, 16: 1192-1209), el tiempo de la etapa es de 1 femtosegundo (fs), y la simulación, basada en el algoritmo de integración Verlet, se corre en NVT canónico (número de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 500K. Esta simulación se hace con restricciones armónicas aplicadas a los átomos de estructura. Se extraen 10 conformaciones diversas, una cada 100 ps, durante por lo menos 1ns de esta primer simulación.

[00394] Estas 10 conformaciones diversas se utilizan después como 10 puntos de partidas diversos para correr 10 simulaciones dinámicas moleculares, sin restricciones en la estructura, a una temperatura de 300K durante 2.3ns en disolvente implícito Nacido Generalizado. Cada simulación MD empieza por una inicialización de las velocidades a partir de una distribución Gaussiana de 298.15K, seguido por un periodo de equilibrio 300ps. Todos los enlaces se restringen utilizando el algoritmo SHAKE (ver Barth. et al., J Comp Chem, .1995, 16:1192-1209), el tiempo de la etapa es de 1fs, y la simulación, se basa en el algoritmo de integración Verlet, se corre ensamble NVT (numero de partículas, volumen y temperatura) a una temperatura de 298.15K. durante el periodo de producción, se almacenan 2.000 instantáneas una cada 1ps. El Lenguaje de Vector Científico (SVL), disponible dentro del ambiente de modelamiento molecular (MOE) (Molecular Operating Enviromnent (MOE), Chemical Computing Group, Quebec, Canada), se utiliza para codificar el siguiente protocolo post-tratamiento.

[00395] Primero, cada instantánea, N, se superpone óptimamente sobre su predecesor, la instantánea N-1, para descartar el movimiento rotacional y trasnacional general que ocurre durante el modelamiento MD y el cálculo. Se obtiene la superposición al minimizar la raíz cuadrada de la distancia (RMSD) entre todos los pares de átomos correspondientes de las dos instantáneas. Solo los átomos pesados de la estructura del anticuerpo se consideran en la operación de superposición. Utilizando el mismo método de superposición, se superpone cada instantánea sobre la instantánea medoïd. La instantánea medoïd es la conformación de anticuerpo con las coordenadas cartesianas más cercanas desde las coordenadas promedio de todas las conformaciones. Para cada una de las de las 10 simulaciones MD, se utilizan las últimas 2.000 conformaciones para cuantificar, para cada aminoácido de anticuerpo de murino, la desviación de las posiciones atómicas con respecto a una conformación medoïd del aminoácido. Para cada uno de los residuos de anticuerpo i, el RMSD entre los átomos pesados de la conformación J y un metoïd de referencia de conformación K. El RMSD tiene la siguiente fórmula, con dLK definido como la distancia Euclidiana expresada en Angstroms (Å) entre el átomo pesado l del residuo j y su contraparte de la conformación de referencia medoïd K. Para la asociación en forma de pares de átomos pesados l. la simetría de los átomos de cadena pesada laterales para los aminoácidos Asp, Leu, Val, Glu, Arg, Phe y Tyr, también se considera. La conformación de referencia K varía de un residuo a otro y corresponde a la conformación medoïd K con la distancia Euclidiana más cercana a las coordenadas promedio de todas las conformaciones del residuo i estudiado.

[00396] Se encuentran mutaciones humanizantes al determinar cual línea germinal de anticuerpo humano es la más similar al anticuerpo de murino en términos de sus aminoácidos más flexibles. Para hacer eso, se comparan los movimientos de los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo de murino durante 20ns (10 x 2ns) de estimulación dinámica molecular, con los movimientos de los aminoácidos correspondientes de 49 modelos de homología de líneas germinales de anticuerpo humano, para cada una de las cuales se han corrido 10 simulaciones dinámicas moléculas utilizándole mismo protocolo. Los 49 modelos de homología 3D de las líneas germinales de anticuerpo humano se construyen al combinar sistemáticamente las 7 cadenas ligeras humanas más frecuentes (vkl, vk2, vk3, vk4, vl1, vl2, vl3) y las 7 cadenas pesadas más frecuentes (vh1a, vhlb, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nudeic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

[00397] Se excluyen los 60 aminoácidos más flexibles de cualquier aminoácido en la CDR, y su vecindad inmediata, es decir aminoácidos con un carbono α a una distancia de menos 5Å a cualquier carbono α de aminoácidos CDR como se ve en el modelo de homología 3D.

[00398] La flexibilidad cuantifica al comparar RMSD (Fi) de un aminoácido dado (i) con su conformación medoid como se define previamente, promediado sobre 10 simulaciones dinámicas moleculares, con el RMSD (Fm) de todos los aminoácidos del anticuerpo de murino, promediados sobre las mismas 10 simulaciones dinámicas moleculares. Se considera un aminoácido suficientemente flexible para interactuar potencialmente con los receptores de células T, y activan una respuesta inmunológica, si la clasificación de flexibilidad Zi, definida como $Z_i = (F_i - F_m) / F_m$, está por encima de 0.5.

[00399] Utilizando este protocolo de estimación de flexibilidad promedio dinámico molecular, se han considerado 23 aminoácidos como flexibles en la región variable durante 16D7 de murino que excluye la región CDR y su vecindad inmediata.

[00400] El conjunto de residuos flexibles de cadena ligera incluye los siguientes residuos (numeración secuencial): R16, EI7, R44, G46, Q47, S48, R79, R82, E84, E86, y E 110; y para la cadena pesada incluyen los siguientes residuos: K5, P41, G42, K43, K64, InO, D72: N73, S74, Q75, Q86, y Q103.

[00401] La similitud cuatridimensional del anticuerpo de murino para los modelos 49 de homología de línea germinal humana se cuantifican al muestrear las posiciones de los átomos específicos de los 60 aminoácidos flexibles, utilizando todas las instantáneas de picosegundos de las 10 simulaciones dinámicas moleculares, por medio de única rejilla cúbica tridimensional. Esta rejilla tiene una resolución de 1Å. La rejilla tridimensional se hace de 445.740 puntos y se ha inicializado utilizando la estructura tridimensional de un modelo cristalográfico de anticuerpo humano basado en anticuerpo, 8FAB (Biochem 30:3739-3748,. 1991). También se utiliza el modelo 8FAB para posicionar todas las conformaciones instantáneas de picosegundos de un anticuerpo que se muestrean en la rejilla tridimensional. Para este propósito, la conformación medoid de la dinámica molecular del anticuerpo se superpone sobre el modelo 8FAB. Esta superposición consiste de alineamiento de los momentos de inercia de los dos modelos, seguido por la minimización de las

distancias escalables entre los carbonos λ de ambos modelos. Todas las conformaciones restantes de la simulación dinámica molecular se sobreponen sobre la conformación medoid utilizando el mismo método.

[00402] Se hacen dos tipos de muestreo que resultan en dos similitudes (similitud electrostática y similitud lipófila), para un par de anticuerpos que se comparan. Estas dos similitudes se agregan luego para obtener la similitud total. El muestreo electrostático considera todos los átomos de la cadena lateral de aminoácidos. El valor de un punto, x , de la rejilla se obtiene al aplicar una función Gaussiana tridimensional ponderada $f(x)$ con la carga parcial atómica como se describe en el campo de fuerza Amber 99 (Cicplak et al.; J. Comp. Chem. 2001, 22: 1048-1 057). La función $f(x)$ se aplica a los 3 ejes de coordenadas cartesianas utilizando la siguiente fórmula:

$$f(x) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \right)^3 \times \exp\left(-\frac{(x-u)^2}{2s^2} \right)$$

x y u son, respectivamente, las coordenadas cartesianas de un punto de rejilla y un átomo de aminoácido muestreado, y $s=r/1.6$ (r = residuo de covalencia del átomo). El muestreo se repite para todas las conformaciones del aminoácido y los resultados obtenidos se promedian en todos los puntos de la rejilla tridimensional. El muestreo lipófilo considera solo los átomos lipófilos de la cadena lateral de aminoácidos. El valor de un punto en la rejilla se calcula con la misma función Gaussiana $f(x)$ sin promediar. Como un resultado, los dos ensambles de conformaciones instantáneas de picosegundos de las simulaciones dinámicas moleculares, de los dos anticuerpos se comparan y se muestrean por la misma rejilla tridimensional. Se puede calcular la similitud electrostática (sim-elec), entre el anticuerpo a y el anticuerpo b, con la siguiente fórmula:

$$\text{sim-elec} = \frac{\sum_{i=1}^{445740} \left(\left| x_i^a + x_i^b \right| - \left| x_i^a - x_i^b \right| \right)}{\sum_{i=1}^{445740} \left(\left| x_i^a + x_i^b \right| \right)}$$

la similitud lipófila se calcula con la misma fórmula aplicada a los datos generados por muestreo lipófilo descrito previamente.

[00403] El modelo de línea germinal humana de v λ 2-vh4 presenta la más alta similitud cutridimensional (similitud total=50%) de sus 60 aminoácidos más flexibles con respecto a los 60 aminoácidos más flexibles del anticuerpo de murino 16D7. El modelo de línea germinal humana v λ 2-vh4 se ha utilizado aquí para reemplazar a los residuos flexibles de anticuerpo de murino 16D7. De antemano, los aminoácidos de las dos secuencias se alinean de acuerdo a la superposición óptima de los carbonos α de los modelos de homología correspondientes 3D. Se buscan motivos indeseados en las secuencias humanizadas resultantes utilizando una búsqueda blast, como se describió previamente en el párrafo 41 anterior. Adicionalmente, se buscan epítomos de células T o células B conocidos en las secuencias humanas resultantes utilizando la base de datos IEDB como se describe en el párrafo 44, anterior.

208
110

[00404] La mejor coincidencia de secuencia en el IEDB para la cadena liviana (LC7) es PGKAPQL.LIYRI'vISNL, (SEQ rD NO: 52), que cubre la CDR2. La secuencia presenta 73% de identidad de secuencia con el péptido PGKAPKLLIYAASSL (SEQ JD NO:53) que muestra unión HL.A-DRBI 0404* pero no se ha demostrado que sea inmunogénico en el hombre (J Immunol (1995) 155, 5(55)).[00405J

[00405] La mejor coincidencia en el IEDB para la cadena pesada (HC4 y HC5) es SLIDYGVNVIRQPPG (SEQ ID NO: 54) que cubre la CDRI pero tiene diferencia de residuos significativa como se tipifica por el 40% de identidad de secuencia obtenida de una búsqueda BLAST dentro de la base de datos IEOB.

[00406] Se obtienen dos versiones para la cadena pesada (HC4 & HC5) y una versión para la cadena ligera (Le7). Ambas versiones de la cadena pesada se derivan del modelo de línea germinal humana de vλ2-vλ4. El HC5 es una variante del HC4 con una mutación adicional para superar un residuo problemático potencial: un sitio de desamidación potencial en donde la asparagina, N60, se cambia a un residuo prolina.

[00407] La mutación se introduce a través de la humanización de las cadenas variables que están en minúsculas y subrayadas y las CDR están subrayadas. No se incluyen los dominios constantes.

LC7:

DIVMTQAAPSVAVTP^{gq}SVSISCRSSKSLHSSGKTYLYWFLQhPGkaPQ
LLIYRMSNLASGV^pDRFSGSGSGTAFTL^lISgVqAEDVG^vVYYCMOHLEYP
YTFGGG^tTKLEIK (SEQ ID NO:55)

HC4:

QVQLqESGPGLVAPSQSL^sSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP
PGKGLEWLGVIWGDGTTY^pNSALKSRLS^lSKD^tSkSQVFLKMNSL^lTDDT
AMYYCARIVYWGQGLTVTVSAAK (SEQ ID NO:56)

HC5:

QVQLqESGPGLVAPSQSL^sSITCTVSGFSLIDYGVNWIRQP
PGKGLEWLGVIWGDGTTY^pSALKSRLS^lSKD^tSkSQVFLKMNSL^lTDDT
AMYYCARIVYWGQGLTVTVSAAK (SEQ ID NO:57)

Cadena Ligera (numeración secuencial)	(LC7)	
ARG16	GLY	
GLU17	GLN	
ARG44	HIS	
GLN47	LYS	
SER48	ALA	
ARG79	THR	
ARG82	GLY	
GLU84	GLN	

111
109

Cadena Ligera (numeración secuencial)	(LC7)	
En total para VL	8 mutaciones	
Cadena Pesada	(HC4)	(HC5)
LYS5	GLN	GLN
ASN60	ASN	PRO
ARG70	SER	SER
ASN73	THR	THR
GLN75	LYS	LYS
GLN86	THR	THR
En total para VH	5 mutaciones	6 mutaciones

EJEMPLO 17: FARMACOCINÉTICA

[00408] El estudio se realiza con un número adecuado de animales (por ejemplo, 4 en un estudio; 2 para una sola dosis y 2 para dosis repetidas, 5 dosis por semana) sanos, macacos criados para este fin que pesaban entre 2,0 y 5,4 kg y con edades que variaban entre 2 y 7 años. Los animales pueden asignarse a dos grupos de tratamiento, uno que recibe anticuerpos IgG4 de control y otro que recibe 16D7 humanizado. A los monos de cada grupo se les administra una sola dosis intravenosa en embolada, por ejemplo, 2,5-10 mg/kg en un volumen de dosis de 2-3 ml/kg, o 5 dosis por semana, i.v. Se recogen muestras de sangre a diversos puntos de tiempo después de cada administración de la dosis y se procesan para obtener plasma. Las muestras de plasma se analizan con respecto a la concentración de IgG4 total y mAb CXCR5 utilizando un ELISA.

EJEMPLO 18: ESTUDIOS COMPARATIVOS

[00409] Algunos de los anticuerpos de la presente invención se comparan con anticuerpos disponibles en el mercado en experimentos paralelos. MAB190, disponible en R & D Systems, es un mAb de ratón. RF82B es un anticuerpo de rata anti-CXCR5 humano disponible en BD. El clon 2C1 es un mAb de ratón con un marcador GST disponible en Abnova. Los diversos anticuerpos humanizados descritos aquí se isotipifican utilizando reactivos y métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enseñados aquí tienen una cadena ligera κ , muchos son IgG1, mientras que 46C9, 68D3 y H28 son IgG2a. La mayoría de los anticuerpos se unen al extremo amino de CXCR5, y varios de los anticuerpos compiten entre sí por la unión al mismo epítipo o región.

- [00410] El anticuerpo BD se une débilmente a PBMC humanas.
- [00411] Aunque los anticuerpos generalmente no se unían a células de macaco, los anticuerpos 14C9, 19H5, H28, 54G6, 56H6 y 79B7 de la presente invención sí lo hacían.
- [00412] Se descubrió que 16D7 tenía mayor afinidad, por lo menos 10 veces más, que los anticuerpos comerciales, y tiene una velocidad de inactivación 100 veces mejor que los otros anticuerpos.

112

EJEMPLO 18: AUMENTO A ESCALA

[00413] Cada variante de anticuerpo monoclonal se produjo en células HEK293 FS™ cultivadas en suspensión por transfección transitoria de dos plásmidos de expresión que codificaban la cadena pesada o ligera complejados con 293fectin™ (Invitrogen). Las proteínas secretadas se recogen ocho días después de la transfección y se centrifugan. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína A (ProSepvA, Millipore) después de la elución de la columna con amortiguador citrato 25 mM pH 3, NaCl 0,15 M. Los anticuerpos monoclonales se formularon en PBS y se filtraron a través de filtros de 0,22 µm. La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia a 280 nm. Cada lote se analiza por SDS-PAGE (Nupage Bistris/ MES-SDS 10%) en condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero. Cada lote de proteína también se analiza por exclusión molecular (Tricorn 10/300 GL Superdex 200) para determinar la homogeneidad del monómero y la presencia de especies de alto peso molecular.

[00414] A partir de cultivos de 240 ml, se produjo un total de 30 a 40 mg de ocho anticuerpos monoclonales variantes de 16D7 y con una calidad apropiada para los ensayos posteriores *in vitro* e *in vivo*.

[00415] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de descubrir utilizando sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas aquí. Se pretende que dichos equivalentes estén englobados por las reivindicaciones siguientes.

113

REIVINDICACIONES

- 1) Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une específicamente al mismo epítipo de un dominio extracelular de CXCR5 humano como un anticuerpo ANTI-CXCR5 o un fragmento del mismo, donde el anticuerpo ANTI-CXCR5 o un fragmento de él comprende:
 - a) La secuencia de aminoácidos RSSKSLLHSSGKTYLY, RMSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - b) Un dominio variable de cadena ligera comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 15, y dominios variables de cadena pesada comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 - c) La secuencia de aminoácidos de
 - i) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY; o
 - ii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - d) Una cadena ligera variable (V_L) comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, o SEQ ID NO: 21, y una cadena pesada variable (V_H) comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
 - e) Una cadena ligera variable comprendiendo la cadena de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34;
 - f) Las secuencias de aminoácidos de:
 - i) RSSKSLLHSSGKTYLY, RMSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - ii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY; o
 - iii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSSLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - g) Una cadena ligera variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una cadena pesada variablecomprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;
 - h) Una cadena ligera variable comprendiendo la secuencia de aminoácidosde SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 43, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47;
 - i) Una cadena ligera variable comprpendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una cadena pesada variable comprpendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57; o
 - j) La secuencia de aminoácidos de RSSKSLLHSSGKTYLYW, RMSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY.

114
9/22

- 2) Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo anti-CXCR5 o un fragmento de él a un dominio extracelular de un CXCR5 humano por al menos 95% en un inumunoensayo donde el anticuerpo anti-CXCR5 o fragmento del mismo comprende:
 - a) La secuencia de aminoácidos de RSSKSLLHSSGKTYLY, RMSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - b) Un dominio variable de cadena ligera comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 15, y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 - c) La secuencia de aminoácidos de
 - i) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY; o
 - ii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSSNLAS, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - d) Una cadena ligera variable (V_L) comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, o SEQ ID NO: 21, y una cadena pesada variable (V_H) comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
 - e) Una cadena ligera variable comprendiendo la cadena de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO: 32, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34;
 - f) Las secuencias de aminoácidos de:
 - i) RSSKSLLHSSGKTYLY, RMSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - ii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY; o
 - iii) RSSKSLLHSSGKTYLY, RLSSLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY;
 - g) Una cadena ligera variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;
 - h) Una cadena ligera variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 43, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47;
 - i) Una cadena ligera variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y una cadena pesada variable comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 57; o
 - j) La secuencia de aminoácidos de RSSKSLLHSSGKTYLYW, RMSNLA, MQHLEYPYT, GFSLIDYGVN, VIWGDGTTY, e IVY.

115
113

- 3) El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el anticuerpo o fragmento del mismo además comprende uno o más dominio de región constante
- 4) El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el anticuerpo o fragmento del mismo además comprende un C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} o una combinación de ellos
- 5) El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 3 donde uno o más dominios de región constante provienen del anticuerpo IgG
- 6) El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG4
- 7) Una molécula de ácido nucleico aislada, codificando el anticuerpo o un fragmento del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2
- 8) Un vector comprendiendo la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7
- 9) Una célula hospedera aislada comprendiendo el vector de la reivindicación 8
- 10) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
- 11) Una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

114
116

RESUMEN

La presente invención se relaciona a anticuerpos humanizados que se unen específicamente al CXCR5 y, por ejemplo, pueden inhibir la función de CXCR5. La invención también incluye usos de los anticuerpos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos relacionados con CXCR5.

RBL\RBL\ID-236856\WPC14775

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 1

DE LA ESCRITURA NUMERO:
FECHA: 26/Julio/2010

3870

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO
DE GESTION
DE LA CALIDAD

CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO 3.870 - - - -
TRES MIL OCHOCIENTOS SETENTA - - - -
DE FECHA: JULIO VEINTISEIS (26) - - - -
DE DOS MIL DIEZ (2010) - - - -
OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL
CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. - - - -

ACTO: PODER - - - -

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS Nit. 860.041.367-3

APODERADOS: - - - -

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ C.C. 35.456.344

NIDIA OSORIO LOPEZ C.C. 39.787.682

OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA C.C. 79.524.634

EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY C.C. 52.006.265

JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL C.C. 16.209.380

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí AMPARO
QUINTERO ARTURO - Notaria(o) Sexta(o) (6) - - - - de este Círculo
Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes
términos: - - - -

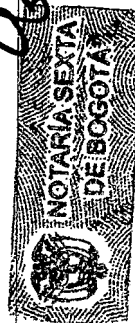
Compareció: con minuta escrita la señora ADRIANA ZAPATA GIRALDO, mayor
de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía
No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: - - - -

----- ESTIPULACIONES -----

PRIMERA: Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad
denominada CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35,
Bogotá, Colombia. - - - -

SEGUNDA: Que SANOFI-AVENTIS, sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia, domiciliada en 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia,
designó a CAVELIER ABOGADOS como su representante para la Propiedad
Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en
la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. - - - -

TERCERA: Que en su carácter de representante legal de CAVELIER
ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por SANOFI-AVENTIS,
confiere poder a los abogados LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, T.P.A. No. 23.555,
identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, NIDIA



OSORIO LOPEZ, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

CUARTO: Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

QUINTO: Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **28 de Mayo de 2010** por **SANOFI-**



01



* 9 4 7 1 9 8 3 7 *

112
119

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTA FE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTA FE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA)..

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.

FECHA

NOTARIA

INSCRIPCION

842

10-V-1.977

18. BTA.

27-V-1.977-NO. 46.204

3.430

1-VII-1.980

6A. BTA.

3-IX-1.980-NO. 89.582

4.844

10-IX-1.980

6A. BTA.

8-X-1.980-NO. 91.261

432

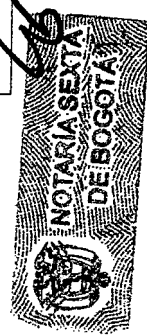
10-II-1.983

6A. BTA.

1-III-1.983-NO. 129.337
COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

26 JUL. 2010

ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006	BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506

CERTIFICA:

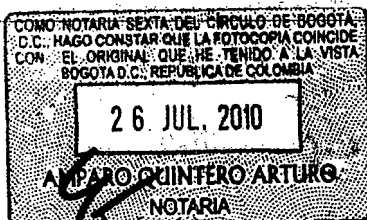
VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :
- SOCIO CAPITALISTA (S)





01



* 9 4 7 1 9 8 3 8 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 2 de 3

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

NO. CUOTAS: 8,800.00

VALOR: \$8,800.00

N.I.T. 000008001722568

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

NO. CUOTAS: 1,200.00

C.E. 000000000131100

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

VALOR: \$1,200.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000035456344

CHAVARRO JORGE

VALOR: \$0.00

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000016209380

TOTALES

VALOR: \$0.00

NO. CUOTAS: 10,000.00

VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO,

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

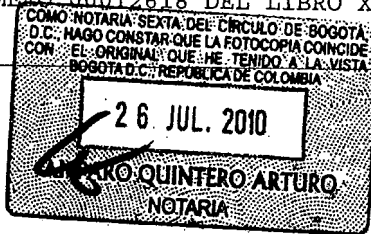
IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

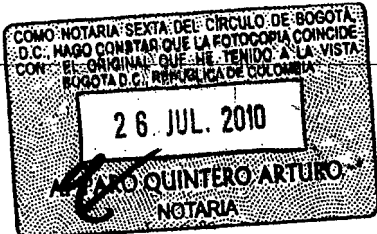
C.C. 000000002877924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,



FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	
NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
CERTIFICA:	
QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.	
CERTIFICA:	
FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.	
CERTIFICA:	
** REVISOR FISCAL **	
QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	
NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024
CERTIFICA:	
DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.	





01



* 9 4 7 1 9 8 3 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 3 de 3

*** EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE ***
*** FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO ***

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

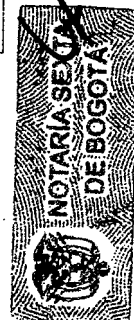
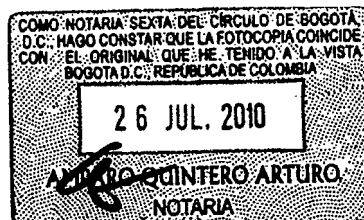
RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





REPRESENTACION

REPRÉSENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/Je (nous) soussigné(s)

SANOFI-AVENTIS

domiciliado (s)

domicilié(s) à 174 Avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

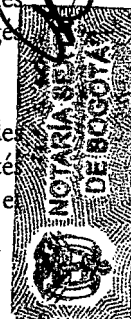
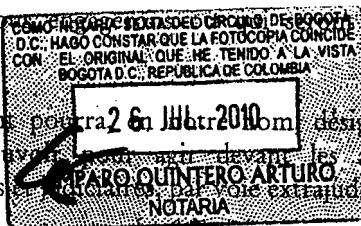
CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

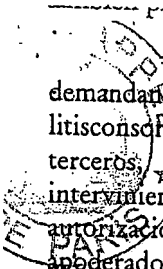
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y

Par le présent instrument, procède (procédons) à la désignation de CAVELIER ABOGADOS, une société collective constituée conformément aux lois de la République de Colombie selon l'acte No. 6233 déposé le 10 septembre 1974 au rang des minutes à l'étude de notaire six de l'arrondissement notarial de Bogota, sise à Bogota D.C., titulaire de l'immatriculation commerciale No. 00820237 et du matricule fiscal 860041367-3, sise Carrera 4 No. 72 - 35, Bogota, Colombie, comme notre représentant pour toutes les affaires de Propriété Industrielle, ayant la faculté de recevoir des notifications et de nommer les fonds des pouvoirs judiciaires ou extrajudiciaires.

CAVELIER ABOGADOS pourra également nous représenter, avec les mêmes facultés ci-dessus indiquées, devant toute entité ou toute personne, ayant ou non juridiction, toute administration ou toute autorité juridictionnelle, tout tribunal d'arbitrage, dans des affaires de nature civile, commerciale, pénale, constitutionnelle, de concurrence, de concurrence déloyale, administrative, contentieuse-administrative, de protection du consommateur, de variétés végétales, de noms de domaine, d'oppositions ou d'observations, de radiations administratives et judiciaires, de nullité, de mesures conservatoires, de concession de licences, d'actions de protection juridique des droits constitutionnels, de protection de secrets industriels, de droit réglementaire et en général pour qu'il me(nous) représente dans toutes les actions ou dans tous les procès que nous pourrions engager contre nous.

Le représentant pourra, en notre nom, désigner des fondés de pouvoir pour agir devant les autorités administratives et judiciales, par voie extrajudiciaire et





...procès-verbal en notre nom, comme également dans des procès en notre nom, en tant que

demandant, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

demandeurs, défendeurs, cointéressés, agents officieux, tiers, pour appel en garantie ou comme intervenants ad excludendum. Dans le cadre de cette autorisation, le représentant pourra autoriser les fondés de pouvoir qu'il désignera à transiger, concilier, admettre les faits du procès, désister, radier, recevoir, renoncer et substituer le pouvoir qui lui sera octroyé. De même, le représentant aura la faculté de révoquer le pouvoir ainsi octroyé au moment où il jugera opportun. Le représentant pourra en tout cas ratifier les actes d'agents officieux.

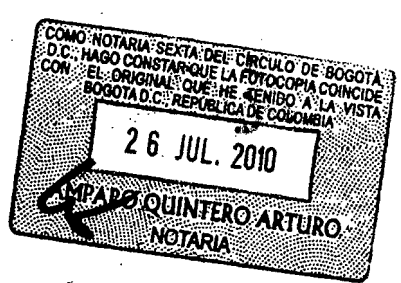
12
123

Dado y firmado hoy/Fait et signé
aujourd'hui le
en/à Paris

28 Mai 2010

por/par
Firma/Signature
Josiane MERLIER
Directeur, Administration Brevets

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de **Mme Josiane MERLIER**.
apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document



(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

Le présent acte, public

3. agissant en qualité de... **Notaire**

3. agissant en qualité de... **Notaire**

4. est revêtu du sceau/timbre de. **Son étude**

Attesté

5. à Paris

6. le.....08 JUN 2010.....

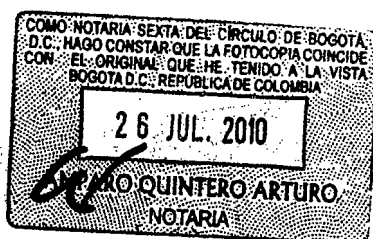
7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 40356 7/10/1971

9. Sceau : **LOAN MART**

Jean MARTIN
.....Avocat général

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



124

TRADUCCION OFICIAL NO. 517/2010

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES; LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN OTORGADO POR **SANOFI-AVENTIS**, DOMICILIADA EN 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, FRANCE, A **CAVELIER ABOGADOS**

DADO Y FIRMADO EL 28 DE MAYO DE 2010 /

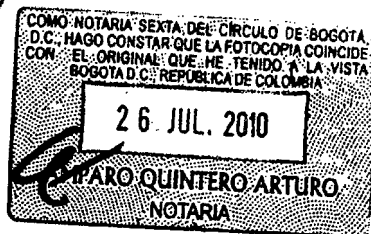
POR: **JOSIANE MERLIER**, DIRECTOR ADMINISTRACIÓN DE PATENTES

EL SUSCRITO ABOGADO **HERVE POMMERY**, NOTARIO DE PARIS, CERTIFICA MATERIALMENTE LA FIRMA DE LA SEÑORA **JOSIANE MERLIER**, PUESTA EN EL PRESENTE DOCUMENTO. ESTA CERTIFICACIÓN NO CONLLEVA NINGUNA VERIFICACIÓN ACERCA DE LA EXACTITUD DE LOS HECHOS Y ACTOS MENCIONADOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO.

FIRMADO: **HERVE POMMERY**, NOTARIO ASOCIADO DE PARIS.

HAY SELLO DEL NOTARIO.

Hde L



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

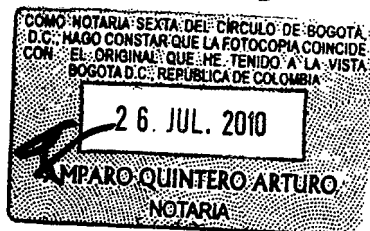
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS
8. BAJO EL NO: 40356
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARIS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



REGISTRADO
071100

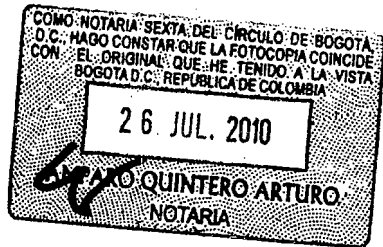
025547

Helena Uribe.
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2000 JUL 27 P 1:00

JEFE DE DELEGACIONES
BOGOTA D.C.





ATTESTATION NOTARIEE

Je soussigné, Maître Hervé POMMERY,
notaire :

CERTIFIE :

Que la signature qui précède de
Mme Josiane MERLIER est
authentique

Que la signataire exerce actuellement la
fonction de

Directeur, Administration Brevets

de la société

SANOFI AVENTIS

Société légalement constituée et existant
selon les lois de France

Domiciliée à

174 Avenue de France
75013 PARIS, (France)

Et que la signataire est dûment autorisée à
concéder le présent document.

Fait et signé à *PARIS*

Le *7 juin 2010*

Signature : Hervé POMMERY
NOTAIRE

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El infrascrito, Maître Hervé POMMERY,
Notario :

CERTIFICA :

Que la Firma que antecede de
Sra. Josiane MERLIER es auténtica

Que el signatario desempeña actualmente
el cargo de

Directeur, Administration Brevets

de la compañía

SANOFI AVENTIS

Sociedad que actualmente existe y está
organizada de acuerdo a las leyes de
FRANCIA

Que la dirección de dicha compañía es

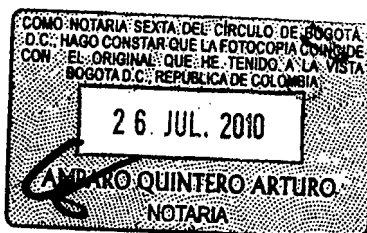
174 Avenue de France
75013 PARIS, (Francia)

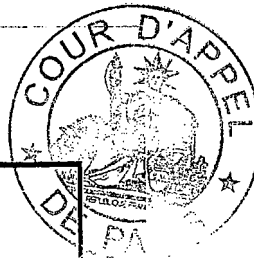
Y que el signatario tiene facultad para
otorgar este documento.

Dado y firmado en *PARIS*

El *7 junio de 2010*

Firma : Hervé POMMERY
NOTAIRE





APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. M^e POHMER

3. agissant en qualité de. Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de. Son étude

Attesté

5. à Paris

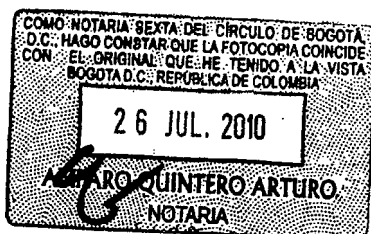
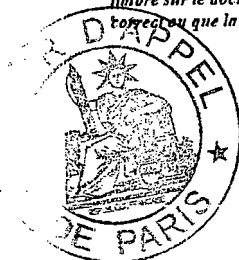
6. le. 08 JUIN 2010

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 40355

9. Sceau : Jean MARTIN
"Procureur général"

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



127
225

TRADUCCION OFICIAL NO. 517/2010

AUTENTICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

EL INFRASCRITO ABOGADO HERVE POMMERY, NOTARIO, CERTIFICA QUE LA FIRMA QUE ANTECEDE DE LA SEÑORA JOSIANE MERLIER ES AUTENTICA; QUE EL SIGNATARIO DESEMPEÑA ACTUALMENTE EL CARGO DE **DIRECTOR, ADMINISTRACIÓN DE PATENTES**, DE LA SOCIEDAD **SANOFI AVENTIS**, SOCIEDAD QUE ACTUALMENTE EXISTE Y ESTA ORGANIZADA DE ACUERDO A LAS LEYES DE FRANCIA, QUE LA DIRECCION DE DICHA COMPAÑÍA ES 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, (FRANCIA) Y QUE EL SIGNATARIO TIENE FACULTAD PARA OTORGAR ESTE DOCUMENTO.

DADO Y FIRMADO: EN PARIS EL 7 DE JUNIO DE 2010

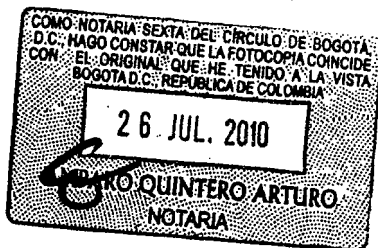
FIRMADO: HERVE POMMERY, NOTARIO DE PARIS

HAY SELLO DEL NOTARIO

Heve



3



226
128

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

2. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

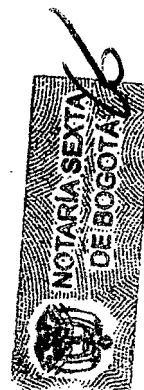
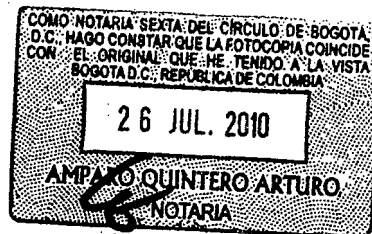
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARÍS
8. BAJO EL NO: 40355
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARÍS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



SECRETARIA DE
RELACIONES EXTERIORES

025549

Helena Uribe
Cuya firma aparece en el
documento de semperna
a funciones indicadas

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 JUL 26 P 1:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

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



AVENTIS, documento que está debidamente legalizado. --

Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO** domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído, el presente instrumento público por el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

DERECHOS NOTARIALES: \$ 42.860.00 -----

IVA: \$ 14.732.00 -----

RECAUDO SUPERINTENDENCIA: \$3.570.00 -----

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO: \$3.570.00 -----

RESOLUCIÓN 10301 DE DICIEMBRE 17 DE 2009 -----

PAPEL NOTARIAL: El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: 7-700044-126454 7-700044-125990

EN BLANCO... EN BLANCO

Adriana Zapata Giraldo
ADRIANA ZAPATA GIRALDO

C.C. 51680061

TEL. 2110348

Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO
NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) DE BOGOTÁ, D.C.

T CAVELIER.Angelica.PE



ES FIEL Y PRIMERA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 3870 DE FECHA 26 DE JULIO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 12 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA D.C. JULIO 27 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



AMPARO QUINTANA ARTURO
NOTARIA

130
128

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0014242
		Bogotá D.C., Febrero 13 de 2013 - 10:45:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197827836	13/02/2013	34.841.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	450.000.00
			\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-037770-A-00000-0000
Fecha: 2013-03-08 13:53:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-037770-00009-0000
Fecha: 2013-02-28 16:52:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 129

COLO: 14775 - 841 - 1791-6.

131

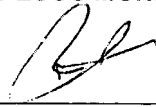
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0019158
		Bogotá D.C., Febrero 27 de 2013 - 07:54:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871780	26/02/2013	18.414.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-037770-A-00000-0000
Fecha: 2013-03-08 13:53:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 131

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-037770-00009-0000
Fecha: 2013-02-28 16:52:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 129 131

COLO: 14775-841-1796