

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

09-789779

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/24**

71. SOLICITANTE **ASTRAZENECA AB Y MEDIMMUNE LIMITED**

DOMICILIO **SÖDERTÄLJE, SUECIA Y CAMBRIDGE, INGLATERRA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLORED A RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **29 JUL 2003**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-078979- -00000-0000

Fecha: 2009-07-29 15:53:08 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 177

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ASTRAZENECA AB Y
MEDIMMUNE LIMITED**

Dirección: SE-151 85 Södertälje, Suecia y
Milstein Building, Granta Park, Cambridge
Cambridgeshire CB21 6GH, Inglaterra.

Nacionalidad o Domicilio: Södertälje,
Suecia y Cambridge, Inglaterra.

Lugar de Constitución: Suecia.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BARKER, Wendy y KEYES, Feenagh, Anne.

Dirección: AstraZeneca R & D Alderley, Alderley Park, Macclesfield Cheshire
SK10 4TG y MedImmune Limited, Milstein Building, Granta Park, Cambridge
Cambridgeshire CB21 6GH.

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2008/000567

Fecha: 20/02/08

Publicación Internacional No. WO 2008/102123 A1

Fecha: 28/08/08

⑥

Título (54)

"ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/24

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

21/02/07

26/03/07

(31) Número de Solicitud

60/890,888

60/908,041

⑨

Comprobante de Pago No. 09-47,307

Fecha: 30 de Junio de 2009

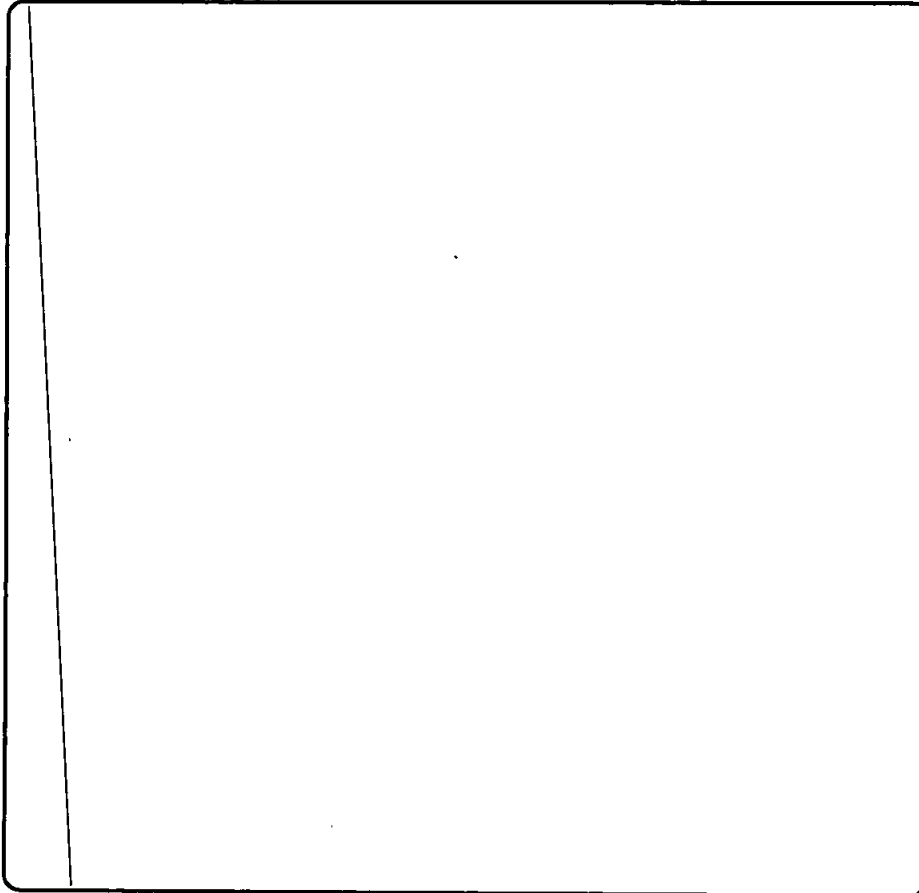
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. (Poder AstraZeneca AB).
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicitó la concesión de la patente.

NOMBRE ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C 39.690.713

T.P 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 47,307
FECHA : JUNIO 30 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-078979- -00000-0000

Fecha. 2009-07-29 15 53 08 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 177

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	98913382	30/06/2009	17,760,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-08-09-397 de un documento escrito en Inglés, la cual para efectos del presente lleva el sello personal de **Martha Lucía Arciniegas M.**, Traductora e Intérprete Oficial en virtud de la Res 1523 /88 del Ministerio de Justicia.

Legalización de un Poder de Representación Legal conferido a: ALICIA LLOREDA, y/o GUSTAVO TAMAYO, y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ otorgado por **AstraZeneca AB**

Firmado por:

SIMON RICHARD REEVES

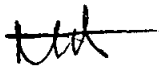
Certificación Notarial

Certificación de la firma precedente, debidamente legalizada por Notario Público,
John Haig Ekserdjian

[Sello Lacrado de Notario Público]

JOHN HAIG EKSERDJIAN
Notario Público de Wilmslow, Cheshire, Inglaterra




MARTHA LUCÍA ARCINIEGAS M.
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION 1523/88 MINJUSTICIA

APOSTILLA

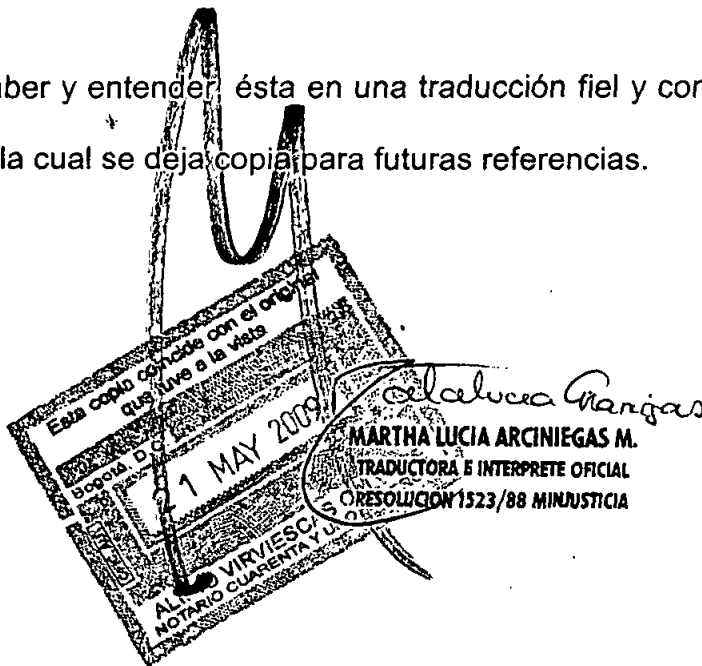
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado por **John Haig Erkserdjian**
3. actuando como **Notario Público**
4. y lleva el sello/estampilla **del Mencionado Notario Público**

Certificado

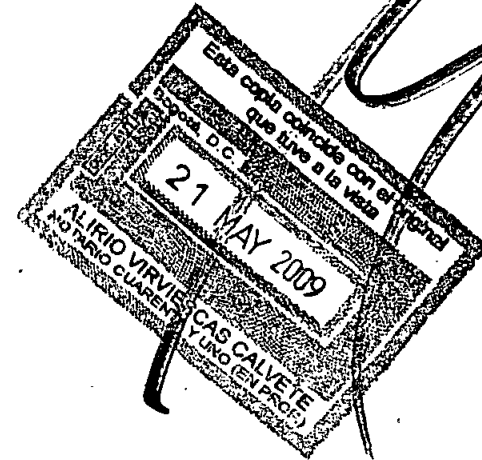
5. en Londres
6. el 2 de agosto del 2004
7. Por el Secretario Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. No. **G479981**
9. Timbre/Sello
Aparece el Sello de la Oficina
de Asuntos Exteriores y del Commonwealth
10. Firma
E.M. Fitzgerald

Según mi leal saber y entender ésta en una traducción fiel y completa de su original en inglés, de la cual se deja copia para futuras referencias.



250168
Mirsha Arciniegas
Cuya firma aparece en el
documento de semipena
las funciones indicadas

ABUZE
12-06
JEFE DE LAS FUNCIONES
DE LA U.C.



Los abajo firmados, AstraZeneca AB, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suecia,

con domicilio en

SE-15185 Sodertalje, Suecia,

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 22 de Julio de 2004 en Macclesfield, Inglaterra

The undersigned, AstraZeneca AB, a corporation organized and existing under the laws of Sweden,

domiciled at

SE-15185 Sodertalje
Sweden

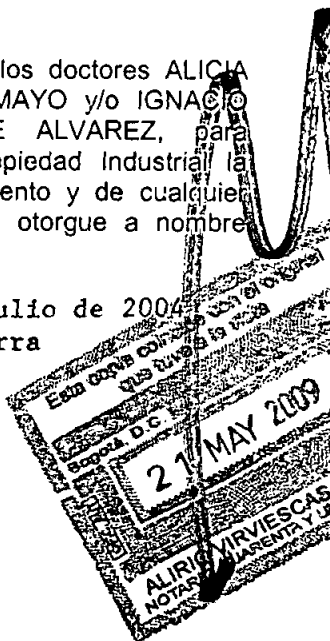
hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 22nd day of July 2004 at Macclesfield, England

SIMON RICHARD REEVES
Duly Authorised Signatory



46716

6

{ss

{ss

Hoy 26 de Julio de 2004, compareció
Simon Richard Reeves, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es firmante autorizado

de, **AstraZeneca AB**,
la compañía nombrada en el documento que
antecede, una sociedad debidamente organizada y
existente conforme a las leyes de Suecia
, domiciliada en la
ciudad de Vastra Malarehamnen 9, SE-151
85 Sodertalje, Suecia,
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social
conforme a las leyes de Suecia

que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder; que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Stockholm
, con fecha Oct. 31/1913
y certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

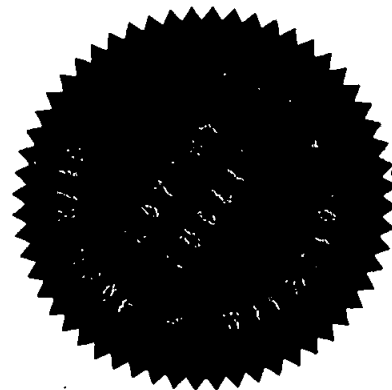
On this 26th day of July, 2004,
personally Simon Richard Reeves
came
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the a
duly authorised signatory of, **AstraZeneca AB**,
the company named within, a Corporation organized
and existing under the laws of Sweden
, domiciled at
Vastra-Malarehamnen 9, SE-151 85 Sodertalje,
Sweden
legally constituted for a period of tenure not yet
expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of Sweden

that the deponent is authorized by said Company to
confer this power of attorney; that the seal affixed
hereunto by the deponent in the name and on behalf
of said Corporation is the corporate seal thereof; and
that the purpose for which this instrument is granted
is included within the corporate purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
STOCKHOLM
under date of 31 October 1913
and hereby certifies that under the laws of said State
the foregoing acknowledgment is sufficient proof that
the facts therein contained are true, which he attests.



J. H. Hsing
Notary Public
Wilkes-Barre
Peshawar
England



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **John Haig Ekserdjian**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le **02 August 2004**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G479981**

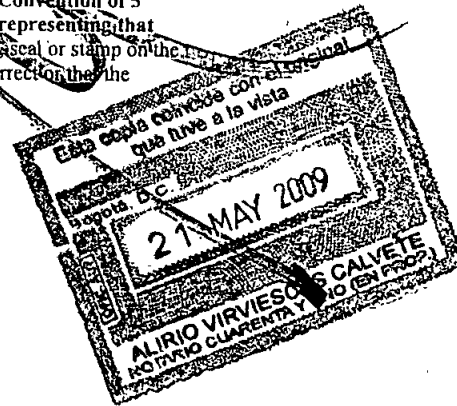
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **E. M. Fitzgerald**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/24	
(22) Fecha de solicitud: 29-07-09		(71) Solicitante(s): ASTRAZENECA AB Y MEDIMMUNE LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/890,888 60/908,041	(32) Fecha 21-02-07 26-03-07	(33) País US US
		(72) Inventor(es): BARKER, Wendy y KEYES, Feenagh, Anne.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 21-09-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 28-08-08	
Fecha de presentación de la solicitud: 20-02-08		N° publicación: WO 2008/102123 A1	
No. de solicitud: PCT/GB2008/000567			
(54) Titulo: ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un miembro de unión aislado para CXCL13, donde el miembro de unión inhibe la unión de CXCL13 al CXCR5, y donde el miembro de unión compite para la unión al CXCL13 con una molécula de anticuerpo scFv que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11.

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/000567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/286556 A1 (SEGAL BENJAMIN M. [US] ET AL) 21 December 2006 (2006-12-21) the whole document	1,3,4, 7-10, 19-26, 29-32
X	ZHENG BIAO ET AL: "CXCL13 neutralization reduces the severity of collagen-induced arthritis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 52, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 620-626, XP002331562 ISSN: 0004-3591 the whole document	1,3,4,7, 9,10, 29-34, 36-41,43
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2008

Date of mailing of the international search report

27/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2008/000567

C(Continuation). . . DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R&D SYSTEMS: "Monoclonal anti-human CXCL13/BLC/BCA-1 antibody" R&D SYSTEMS DATA SHEET, 11 March 2006 (2006-03-11), pages 1-2, XP002483019 the whole document	1,3,4,7, 9,10
A	WIDNEY DANIEL P ET AL: "Serum levels of the homeostatic B cell chemokine, CXCL13, are elevated during HIV infection" JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, vol. 25, no. 11, November 2005 (2005-11), pages 702-706, XP002483020 ISSN: 1079-9907 the whole document	38,39,43
A	RUPPRECHT T ET AL: "Cytokine CXCL13 - a possible early CSF marker for neuroborreliosis" NERVENARZT, vol. 77, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 470,472-473, XP002483021 ISSN: 0028-2804 the whole document	38,39,43
P,X	WO 2007/122402 A (RENOVO LTD [GB]; FERGUSON MARK WILLIAM JAMES [GB]; O'KANE SHARON [GB];) 1 November 2007 (2007-11-01) the whole document	1-4, 7-11, 19-26, 30-32
P,X	WO 2007/124414 A (CENTOCOR INC [US]; BUGELSKI PETER [US]; DAS ANUK [US]; GRISWOLD DONALD) 1 November 2007 (2007-11-01) the whole document	1,3,4, 7-10, 19-26, 30-32, 36,38, 39,43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/000567

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006286556 A1	21-12-2006	NONE	
WO 2007122402 A	01-11-2007	NONE	
WO 2007124414 A	01-11-2007	US 2008014201 A1	17-01-2008

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 August 2008 (28.08.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/102123 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01)

(74) Agent: ASTRAZENECA INTELLECTUAL PROP-
ERTY: AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).

(21) International Application Number:
PCT/GB2008/000567

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

(22) International Filing Date:
20 February 2008 (20.02.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/890,888 21 February 2007 (21.02.2007) US
60/908,041 26 March 2007 (26.03.2007) US

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

(71) Applicants (for all designated States except US): AS-
TRAZENECA AB [SE/SE]; S-151 85 Södertälje (SE).
MEDIMMUNE LIMITED [GB/GB]; Milstein Building,
Granta Park, Cambridge Cambridgeshire CB21 6GH (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BARKER, Wendy
[GB/GB]; AstraZeneca R & D Alderley, Alderley
Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB). KEYES,
Feenagh, Anne [IE/GB]; MedImmune Limited, Milstein
Building, Granta Park, Cambridge Cambridgeshire CB21
6GH (GB).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

WO 2008/102123 A1

(54) Title: MONOCLONAL ANTI-CXCL13 ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to binding members, especially antibody molecules, for CXCL13. The binding mem-
bers are useful for the treatment of disorders associated with CXCL13, including arthritic disorders such as rheumatoid arthritis.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13

RESUMEN - OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con los miembros de unión, especialmente con las moléculas de anticuerpos para CXCL13. Los miembros de unión son útiles para el tratamiento de los trastornos asociados con CXCL13, incluyendo los trastornos artíticos tal como la artritis reumatoide.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13

Esta invención se relaciona con miembros de unión, especialmente con las moléculas de anticuerpos, para el CXCL13. Los miembros de unión son útiles para el tratamiento de los trastornos asociados con el CXCL13, incluyendo los trastornos artríticos tal como la artritis reumatoide.

El CXCL13 es un potente quimioatrayente de células B, que se dirige a las células B naïve en los folículos de los órganos linfoides secundarios y es constitutivamente expresado por las células dendríticas foliculares (FDC) y las células estromales en las áreas ricas en células B de los órganos linfoides secundarios. El CXCL13 es también conocido como quimoquina 1 atrayente de células B (BCA-1). El CXCL13 señala a través de su receptor CXCR5. El CXCR5 es un receptor acoplado a la proteína G de expansión de siete transmembranas y es un miembro de la subfamilia del receptor de la quimoquina CXC de la familia GPCR de la clase 1. El CXCR5 es expresado a altos niveles en células B naïve y activadas, incluyendo las células B amígdalaares y de la sangre periférica. También es expresado en un subconjunto de células T CD4+ de sangre periférica activada y la mayoría de las células CD4+ en el tejido linfoide secundario. El CXCL13 es el único ligando conocido para CXCR5.

El CXCL13 desempeña una función en el desarrollo de órganos linfoides periféricos; por ejemplo, Ansel y otros [1] han demostrado que los ratones deficientes en CXCL13 tienen graves defectos en el desarrollo del nodo linfoide periférico. El CXCL13 induce la expresión de la linfo toxina $\alpha 1\beta 2$ en la membrana en las células B naïve incluidas en los folículos, lo que promueve la maduración de las FDC y mejora además la producción de CXCL13 [1]. Los ratones deficientes en CXCL13, inmunizados con un antígeno dependiente de las células T, forman centros germinales en los nodos linfoides y del bazo pero estos son pequeños y tienen una arquitectura irregular que sugiere que el CXCL13 es

requerido para el reclutamiento y correcto posicionamiento de las células B dentro de los folículos [1].

El CXCL13 también tiene una función en la inmunidad innata; los ratones deficientes en CXCL13 carecen de células B1 en la cavidad peritoneal y pleural y son deficientes en la producción de anticuerpos naturales para los antígenos bacterianos en la cavidad corporal (Ansel, KM. y otros. *Immunity*, 16: 67-76, 2002).

Existe evidencia de la intervención de CXCL13 en una variedad de trastornos, como se discutió aquí en otro lugar.

Los miembros de unión de CXCL13 han sido reportados en el arte. Por ejemplo, MAB801 es un anticuerpo monoclonal CXCL13 murino anti-humano comercialmente disponible (R & D Systems: MAB801). El MAB470 es un monoclonal CXCL13 de rata anti-ratón.

Mediante la utilización de técnicas de selección apropiadamente diseñadas y ensayos, hemos desarrollado miembros de unión para CXCL13 que inhiben la unión de CXCL13 a su receptor CXCR5 blanco.

Un miembro de unión de la invención inhibe la unión de CXCL13 al receptor blanco, CXCR5. La inhibición de la unión puede ser inhibición directa.

Los miembros de unión para el CXCL13, también referidos como miembros de unión CXCL13, son descritos aquí. Los miembros de unión se unen y pueden neutralizar el CXCL13 humano y CXCL13 de primate no humano por ejemplo el CXCL13 cinomólogo. El CXCL13 no humano se refiere a un ortólogo de CXCL13 que existe de manera natural en una especie distinta de la humana.

Los miembros de unión de la invención son normalmente específicos para el CXCL13 sobre otros miembros de la familia CXC de quimoquinas, incluyendo por ejemplo, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL10 y/o CXCL12 y así se une al CXCL13 selectivamente. Esto

puede ser determinado o demostrado por ejemplo en un ensayo de competencia. Por ejemplo, un ensayo adecuado es descrito aquí en el Ejemplo 2.5.

Los miembros de unión son útiles para inhibir la unión de CXCL13 al CXCR5 *in vivo* o *in vitro*, y pueden ser usados para tratar trastornos asociados con el CXCL13, tal como la artritis reumatoide, como es descrito en detalles aquí en otro lugar.

Como es descrito con más detalles a continuación, los miembros de unión de acuerdo con la invención han sido mostrados para neutralizar el CXCL13 con alta potencia. La neutralización significa inhibición de una actividad biológica de CXCL13. Los miembros de unión de la invención pueden neutralizar una o más actividades de CXCL13. La actividad biológica inhibida es típicamente la unión de CXCL13 a una pareja de unión. Por ejemplo, la actividad biológica inhibida puede ser la unión de CXCL13 al CXCR5.

De acuerdo con la invención, la unión de CXCL13 humano o no humano al CXCR5 puede ser inhibida, por ejemplo un miembro de unión puede inhibir la unión de CXCL13 de primate, no humano tal como cinomólogo, al CXCR5. El CXCR5 puede ser humano o no humano, tal como de primate no humano, por ejemplo cinomólogo, o CXCR5 de ratón. En un aspecto el CXCR5 es de la misma especie que el CXCL13. Típicamente el CXCR5 es el CXCR5 humano.

La neutralización de la unión de CXCL13 al CXCR5 puede por ejemplo ser medida como una función de la actividad mediada por una señalización del CXCR5, ya que la unión de CXCL13 al CXCR5 estimula tal actividad.

Ya que el CXCR5 es un receptor acoplado a la proteína G, la actividad puede ser una actividad asociada con receptores acoplados a la proteína G.

Por ejemplo, la unión de CXCL13 al CXCR5 puede resultar en la regulación hacia abajo de la actividad de la adenilil ciclasa y una disminución en los niveles de AMPc celular, a través de la liberación de la subunidad G α i de la proteína G, la cual inhibe la adenilil ciclasa. Por lo tanto un ensayo adecuado puede comprender detectar una inhibición de la disminución en los niveles de AMPc celular que ocurre en ausencia del miembro de unión es decir un ensayo AMPc referido aquí mide la inhibición (por un miembro de unión de la invención) de las disminuciones en los niveles de AMPc celular mediadas por el CXCL13. Típicamente, las células usadas en el ensayo AMPc son co-estimuladas con un activador de la adenil ciclasa, tal como NKH477. Las células adecuadas para usar en un ensayo de este tipo son descritas aquí.

Los ensayos de AMPc adecuados (celulares) incluyen aquellos que combinan las técnicas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y fluorescencia resuelta en tiempo (TRF) en un formato de ensayo homogéneo (un ensayo AMPc TRF/FRET como es referido aquí). Los ejemplos de un ensayo AMPc TRF/FRET incluyen el ensayo AMPc HTRF[®] (Fluorescencia homogénea resuelta en tiempo) (CisBio International) (ver, por ejemplo Gabriel D y otros, (2003) Assay and Drugs Development Technologies 1(2): 291-303) y el ensayo AMPc LANCE[®] (Perkin Elmer) (ver, por ejemplo Hemmila y otros (1999) J Biomol Screen 4(6): 303-308).

La FRET se refiere a una transferencia de energía no radiactiva de energía de excitación entre un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor adecuados (un par donante-aceptor FRET). Típicamente los componentes del ensayo incluyen: AMPc marcado (AMPc trazador); y anticuerpo específico del AMPc marcado. Cada uno del AMPc trazador y el anticuerpo son marcados con un miembro de un par donante-aceptor. Cuando el anticuerpo se une al AMPc trazador, tiene lugar la FRET y la señal emitida por el aceptor es determinada por TRF. El AMPc libre en una muestra compite con el AMPc trazador para la unión al anticuerpo y reduce la señal de

la FRET. Así el ensayo comprende determinar una señal emitida por el aceptor.

Preferiblemente el ensayo comprende determinar la señal específica de ambos el donante y el aceptor como un control interno para dar una medición de relación, que compensa para la presencia de compuestos coloreados en el ensayo.

En el presente ensayo, el par donante aceptor es típicamente tal que el donante es excitado por la luz a alrededor de 337 a 340 nm. Típicamente, a continuación de la FRET entre el donante y el aceptor, el aceptor emite una señal a alrededor de 665nm (la cual puede ser resuelta en tiempo). Por ejemplo, ambos colorantes XL665 (aceptor en el ensayo AMPc HTRF®) y el Alexa Fluor®-647 (aceptor en el ensayo AMPc LANCE®) emiten una señal de fluorescencia a 665nm. Un donante puede por ejemplo emitir una señal a alrededor 615 a 620nm.

Un aceptor puede ser por ejemplo, un colorante de fluorescencia que absorbe el rojo, en particular un colorante que absorbe el rojo hidrofílico (Buschmann y otros, Bioconjugate Chem. 2003, 14: 195-204). Un colorante de fluorescencia que absorbe el rojo puede ser por ejemplo, Alexa Fluor®-647 (Perkin Elmer) tal como es usado en el ensayo AMPc LANCE®.

Los ejemplos de pares donantes-aceptores incluyen el criptato de europio (donante)/XL665 (aceptor), por ejemplo como es usado en el ensayo AMPc HTRF®, y el quelato de europio (donante)/colorante Alexa Fluor®-647 (aceptor), por ejemplo como es usado en el ensayo AMPc LANCE®.

Tanto el AMPc trazador o el anticuerpo pueden ser marcados con el donante o el aceptor. Así un ensayo puede comprender el uso de (AMPc trazador marcado donante) y (anticuerpo específico AMPc marcado aceptor), o de (AMPc trazador marcado aceptor) y (anticuerpo específico AMPc marcado donante). Por ejemplo, un

ensayo puede comprender el uso de anticuerpo monoclonal anti-AMPC criptato de europio y XL665-AMPC, por ejemplo como en el ensayo HTRF®. Un ensayo puede comprender el uso de AMPC marcado con quelato de europio y anticuerpo AMPC marcado con colorante Alexa Fluor®-647, por ejemplo como en el ensayo LANCE®.

Las señales fluorescentes en un ensayo TRF/FRET son determinadas por TRF.

Un ensayo AMPC TRF/FRET puede ser usado para ensayar la inhibición de las disminuciones en los niveles de AMPC celular mediada por el CXCL13 con la co-estimulación de las células CH0qi5 CXCR5 con el activador de la adenilil ciclasa, NKH477.

En un ensayo HTRF® generalmente, las macromoléculas que pueden unirse unas con otras son marcadas, una con criptato de europio (Eu3+) (donante) y el otro con una segunda marca fluorescente, XL665 (o XLent) (una alofococianina reticulada estable). Cuando las moléculas se unen unas con otras, y tras la excitación (a 337nm), la FRET tiene lugar y XL665 reemite una fluorescencia de larga vida específica a 665nm. En el ensayo, una señal específica del donante (a 620nm) y el aceptor (a 665nm) son medidas como un control interno, dando una medición de relación que compensa para la presencia de compuestos coloreados en el ensayo.

Un ensayo AMPC HTRF® típicamente comprende: mezclar XL665-AMPC (AMPC trazador), anticuerpo monoclonal anti-AMPC-criptato de europio y una muestra conteniendo AMPC; aplicar luz a 337nm (excitando de esta forma el criptato de europio donante); determinar la señal fluorescente a 620nm (donante) y 665nm (aceptor) por TRF; y determinar la relación de la señal 665nm/620nm como una medida de la FRET que ha tenido lugar. Cualquier AMPC libre a partir de una muestra compite con XL665-AMPC (AMPC trazador) para unirse al anticuerpo monoclonal anti-AMPC-criptato de europio. La máxima FRET tiene lugar cuando una

muestra no contiene ningún AMPc y la señal FRET disminuye con el aumento del AMPc muestra.

La tecnología HTRF® toma así ventaja de las posibilidades ofrecidas por la fluorescencia para trabajar en ambas características espectrales de la señal emitida (corrección de la relación patentada) y bajo un modo de detección resuelto en el tiempo (eliminando, por ejemplo la auto fluorescencia). La tecnología es homogénea, lo que significa que las muestras y los reactivos de detección son mezclados en una placa, que puede ser leída en un lector de placa adecuado, el llamado protocolo "mezcla y lee".

El ensayo AMPc LANCE® combina TRF y FRET y también el uso de un colorante Alexa® Fluor movido con rojo (Perkin Elmer), el cual permite un ensayo FRET sin la interferencia del compuesto asociada con los colorantes azules.

Un ensayo AMPc LANCE® típicamente comprende: mezclar un quelato de europio del trazador quelato de europio/estreptavidina-biotina/AMPc, anticuerpo específico de AMPc marcado-Alexa Fluor®-647 y una muestra conteniendo AMPc; aplicar luz a 340nm (excitando de esta forma el europio donante); y determinar la señal fluorescente a 665nm (aceptor) por TRF como una medida de la FRET que ha tenido lugar. La energía residual del quelato produce una luz a 615nm. Cualquier AMPc libre de una muestra compite con AMPc marcado con europio (AMPc trazador) para unirse al anticuerpo monoclonal anti-AMPc marcado-Alexa®. La máxima FRET tiene lugar cuando una muestra no contiene ningún AMPc y la señal FRET disminuye con el aumento del AMPc muestra.

Estándares adecuados pueden ser usados para calibrar el ensayo.

Los protocolos de ensayo y los ejemplos de ejecuciones de estos ensayos son descritos con detalles en la sección de Materiales y Métodos aquí.

Otra actividad mediada por una señalización del CXCR5, la cual puede ser ensayada, para determinar la neutralización de la unión de CXCL13 al CXCR5 es la liberación de calcio inducida por CXCL13. Típicamente un miembro de unión es ensayado para un efecto inhibitor en la liberación de calcio inducida por CXCL13 en las células que expresan CXCR5 y la proteína G Gqi5. La estimulación de estas células con CXCL13 provoca un aumento en el Ca^{2+} citoplásmico en una concentración de manera dependiente induciendo a la liberación de los depósitos intracelulares y el ingreso del medio extracelular. Esto puede ser medido usando colorantes sensibles al calcio en un Lector de Placa de Imagen de Fluorescencia (FLIPR). Por ejemplo, un ensayo de este tipo usa CXCL13 humano y una línea celular CHO transfectada con Gqi5 y CXCR5 humano.

Los ensayos AMPc y los ensayos de liberación de Ca^{2+} pueden ser realizados *in vitro* con una línea celular de mamífero, por ejemplo Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) tal como células CHO K1, que expresan CXCR5 y la proteína G Gqi5 que contiene la subunidad G α i. Las líneas celulares adecuadas pueden ser producidas transfectando las células con ácido nucleico que codifica CXCR5 y Gqi5.

El CXCL13 es un potente quimioatrayente de células B. El CXCL13 señala a través del receptor CXCR5, el cual es expresado a altos niveles en las células B naïve y activadas, y en un subconjunto de células T activadas. Por lo tanto otra actividad, que puede ser ensayada, para determinar la neutralización de la unión de CXCL13 al CXCR5 es la quimiotaxia inducida por CXCL13 en las células B que expresan CXCR5.

Las células B en el ensayo pueden ser células B no primarias. Un ensayo de este tipo usa una línea celular pre-B murina que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano (células B300.19 hCXCR5).

Como alternativa, las células B primarias pueden ser usadas. Un ensayo de este tipo usa una población de linfocitos mezclada aislada del bazo murino.

De esta forma, ensayos adecuados, tal como el AMPc, la liberación de calcio y los ensayos de quimiotaxia de células B pueden ser usados para calcular una potencia del miembro de unión para inhibir la unión de CXCL13 al CXCR5, como es descrito a continuación. Estos ensayos pueden ser usados para calcular la potencia de un miembro de unión para neutralizar la unión de CXCL13 al CXCR5. La potencia de neutralización es calculada como una función de la actividad mediada por una señalización del CXCR5. El ensayo puede medir la potencia de neutralización inducida por CXCL13: disminución en los niveles de AMPc celular; aumento en los niveles de calcio celular; o quimiotaxia de células B.

La inhibición en la actividad biológica puede ser parcial o total. Los miembros de unión pueden inhibir la actividad biológica de CXCL13 al 100%, o al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 60 %, o al menos 50 % de la actividad en ausencia del miembro de unión.

La potencia de neutralización de un miembro de unión puede ser determinada. La potencia es normalmente expresada como un valor IC_{50} , en nM a menos que otra cosa sea declarada. En ensayos funcionales, IC_{50} es la concentración de un miembro de unión que reduce una respuesta biológica en 50 % de su máximo. En estudios de unión al ligando, IC_{50} es la concentración que reduce la unión del receptor en 50 % del nivel de unión específico máximo. La IC_{50} puede ser calculada trazando el % de respuesta biológica máxima como una función del log de la concentración del miembro de unión, y usando un programa de software, tal como Prism (GraphPad) para ajustar una función sigmoideal a los datos para generar valores IC_{50} . La potencia puede ser determinada o medida

usando uno o más ensayos conocidos por la persona experta y/o como es descrito o referido aquí.

La neutralización de la actividad de CXCL13 por un miembro de unión en un ensayo descrito aquí, por ejemplo un ensayo AMPc, liberación de calcio o quimiotaxia de células B, indica que el miembro de unión se une a CXCL13 e inhibe la unión de CXCL13 al CXCR5. Otros métodos que pueden ser usados para determinar la unión de un miembro de unión al CXCL13 incluyen ELISA, Western blotting, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y ensayos bioquímicos.

La potencia de neutralización de un miembro de unión como es calculado en un ensayo usando CXCL13 de una primera especie (por ejemplo humana) puede ser comparada con la potencia de neutralización del miembro de unión en el mismo ensayo usando CXCL13 de una segunda especie (por ejemplo un primate no humano tal como cinomólogo), para evaluar la extensión de la reactividad cruzada del miembro de unión para el CXCL13 de las dos especies. Como alternativa, la reactividad cruzada puede ser evaluada en un ensayo de unión de competencia, como es descrito con más detalles aquí en otro lugar.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia para neutralizar la unión de CXCL13 humano al CXCR5 que es 10 veces su potencia para neutralizar la unión de CXCL13 cinomólogo al CXCR5. La potencia puede por ejemplo ser como se midió en un ensayo AMPc (por ejemplo un ensayo TRF-FRET tal como un ensayo AMPc LANCE®) o en un ensayo de quimiotaxia de células B, con el CXCL13 cinomólogo y humano respectivamente. La potencia en el ensayo AMPc por ejemplo un ensayo AMPc LANCE® con CXCL13 humano puede, por ejemplo, no ser más de 10-, 5-, 4-, 3- ó 2- veces diferente que en un ensayo AMPc con el CXCL13 cinomólogo. La potencia en el ensayo AMPc es como se determinó para una concentración final de CXCL13 cinomólogo y humano de 2 nM. Los ejemplos de datos

obtenidos en un ensayo AMPc LANCE® con el CXCL13 humano y el CXCL13 cinomólogo son mostrados en las Tablas 2 y 5.

Un miembro de unión de la invención puede unirse al CXCL13 humano más fuerte que el CXCL13 cinomólogo. La fortaleza de la unión de un miembro de unión al CXCL13 humano puede por ejemplo no ser más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, ó 2 veces mayor que para el CXCL13 cinomólogo como se midió en un ensayo de unión de competencia. Por ejemplo, la fortaleza de la unión puede no ser más de 4 veces mayor para el CXCL13 humano que para el CXCL13 cinomólogo. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo de competencia con el CXCL13 cinomólogo y humano son mostrados en la Tabla 8.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo AMPc de CXCL13 humano, como es descrito aquí, con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1nM, tal como no más de 5nM. El miembro de unión puede estar en cualquier forma descrita aquí, por ejemplo, un IgG o scFv o cualquier otra forma adecuada.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo AMPc de CXCL13 cinomólogo, como es descrito aquí, con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1nM, tal como no más de 3nM. El miembro de unión puede estar en cualquier forma descrita aquí, por ejemplo, un IgG o scFv o cualquier otra forma adecuada.

Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo AMPc HTRF® de CXCL13 humano con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1nM, tal como no más de 5nM. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo AMPc HTRF® de CXCL13 humano son mostrados en la Tabla 1.

Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo AMPc HTRF® de CXCL13 cinomólogo con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1nM, tal como no más de 3nM. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo AMPc HTRF® de CXCL13 cinomólogo son mostrados en la Tabla 1.

En un ejemplo, por ejemplo cuando un miembro de unión ensayado está en forma de IgG, el miembro de unión puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 5nM en un ensayo AMPc de CXCL13 humano como es descrito aquí con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.9, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0, 0.9, 0.7 ó 0.5nM, tal como no más de 1.4 o no más de 1.6nM.

En un ejemplo, por ejemplo cuando un miembro de unión ensayado está en forma de IgG, el miembro de unión puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 5nM en un ensayo AMPc de CXCL13 cinomólogo como es descrito aquí con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.4 ó 0.2nM, tal como no más de 0.3nM.

Por ejemplo, un miembro de unión de la invención, por ejemplo un IgG, puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 5nM en un ensayo AMPc LANCE® de CXCL13 humano con una concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.9, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0, 0.9, 0.7 ó 0.5nM, tal como no más de 1.4 o no más de 1.6nM. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo AMPc LANCE® de CXCL13 humano son mostrados en las Tablas 2 y 5.

Por ejemplo, un miembro de unión de la invención, por ejemplo un IgG, puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 5nM en un ensayo AMPc LANCE® de CXCL13 cinomólogo con una

concentración final de 2nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.4 ó 0.2nM, tal como no más de 0.3nM. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo AMPc LANCE® de CXCL13 cinomólogo son mostrados en las Tablas 2 y 5.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 40nM en un ensayo de liberación de calcio de CXCL13 humano con una concentración final de 100nM de CXCL13. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 38, 36, 34, 32, 20, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, ó 2nM. Los ejemplos de datos obtenidos en el ensayo de liberación de calcio de CXCL13 humano son mostrados en las Tablas 4 y 7.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo de quimiotaxia de células B de CXCL13 humano con una concentración final de CXCL13 humano que da aproximadamente una respuesta ED80, y una línea celular B no primaria que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ó 1.5nM. Típicamente el ensayo usa una línea celular B, por ejemplo una línea celular pre-B murina que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano, tal como células B300.19 que expresan CXCR5 recombinante humano. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo de quimiotaxia de células B de CXCL13 humano con CXCL13 humano son mostrados en las Tablas 3 y 6.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 10nM en un ensayo de quimiotaxia de células B de CXCL13 cinomólogo con una concentración final de CXCL13 cinomólogo que da aproximadamente una respuesta ED80 y una línea celular B no primaria que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1nM. Típicamente el ensayo usa una línea celular B, por ejemplo una línea celular

pre-B murina que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano, tal como células B300.19 que expresan CXCR5 recombinante. Los ejemplos de datos obtenidos en un ensayo de quimiotaxia de células B de CXCL13 cinomólogo son mostrados en la Tabla 6.

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC_{50} de no más de 40nM en un ensayo de quimiotaxia de células primarias de CXCL13 humano con una concentración final de CXCL13 humano que da aproximadamente una respuesta ED80, y una población de linfocitos mezclados. La IC_{50} puede por ejemplo no ser más de 38, 36, 34, 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 ó 2nM. Típicamente el ensayo usa una población de linfocitos primarios aislados recientemente del bazo del ratón. Un ejemplo de datos obtenidos en un ensayo de quimiotaxia de células B de CXCL13 humano con CXCL13 humano y linfocitos primarios murinos es mostrado en la Tabla 12.

La afinidad y las cinéticas de unión (expresado como la constante de disociación de equilibrio K_D) de los miembros de unión de CXCL13 para el CXCL13 pueden ser determinadas, por ejemplo usando la resonancia de plasmón de superficie por ejemplo BIAcore. Los miembros de unión de la invención normalmente tienen una afinidad por el CXCL13 humano de menos de 400pM, por ejemplo, menos de 380, 360, 340, 320, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, ó 50pM. La afinidad por el CXCL13 cinomólogo es normalmente similar a aquella para el CXCL13 humano. Los ejemplos de datos obtenidos para el CXCL13 humano y el CXCL13 cinomólogo usando BIAcore son mostrados en las Tablas 10 y 11.

Un miembro de unión de la invención puede tener una afinidad por el CXCL-13 humano y CXCL-13 cino de menos de 150pM.

La afinidad y las cinéticas de unión pueden ser medidas usando la resonancia de plasmón de superficie fluyendo el CXCL-13 humano o cino sobre una superficie que comprende el miembro de unión.

En general, y a menos que otra cosa sea especificada, las potencias de neutralización descritas para los ensayos anteriores pueden aplicarse a un miembro de unión ensayado en cualquier forma descrita aquí. Por ejemplo, las potencias pueden aplicarse a moléculas de anticuerpos incluyendo cualquiera de los fragmentos de anticuerpos descritos aquí, por ejemplo miembros de unión IgG.

Formas glicosilatadas y no glicosilatadas de CXCL13 humano fueron obtenidas cuando el CXCL13 fue expresado de manera recombinante en la línea celular de mamíferos (células MEL). La mayoría de CXCL13 humano producido fue no glicosilatado, sin embargo una pequeña fracción conteniendo la forma glicosilatada puede ser obtenida cuando la expresión es escalada. El CXCL13 cinomólogo expresado en células MEL fue glicosilatado. La potencia del anticuerpo 1 para el CXCL13 humano glicosilatado y no glicosilatado fue 10 veces diferente y puede ser considerada equipotente, como se midió en el ensayo de quimiotaxia de células B descrito aquí. Los ejemplos de datos de potencia para el CXCL13 humano no glicosilatado, el CXCL13 humano glicosilatado y el CXCL13 cinomólogo glicosilatado son mostrados en la Tabla 6 en el Ejemplo 2.3. La unión al CXCL13 humano glicosilatado puede representar una ventaja de los miembros de unión de la invención, ya que el CXCL13 endógeno puede ser glicosilatado y por lo tanto el CXCL13 humano glicosilatado puede representar el antígeno terapéutico blanco para la terapia humana.

En los ensayos descrito aquí, el CXCL13 recombinante, por ejemplo CXCL13 humano, puede ser usado en forma glicosilatada o no glicosilatada. Nuestros datos indican que los miembros de unión de la invención pueden unirse a un epítipo en una región de CXCL13 no afectada por la glicosilación (ver Ejemplo 2.3 y Tabla 6). Así, las potencias del miembro de unión en los ensayos descritos aquí para el CXCL13 humano pueden aplicarse para el CXCL13 humano no glicosilatado y para el CXCL13 humano glicosilatado.

Un miembro de unión de la invención no puede tener más de 10-, 5-, 4-, 3-, 2.5-, ó 2 veces mayor potencia para el CXCL13 humano no glicosilatado en comparación con el CXCL13 humano glicosilatado en un ensayo descrito aquí, por ejemplo el ensayo de quimiotaxia de células B. La potencia para el CXCL13 humano glicosilatado puede por supuesto ser mayor que la potencia para el CXCL13 humano no glicosilatado.

La potencia de los miembros de unión de la invención para el CXCL13 humano glicosilatado pueden ser similares o la misma que para el CXCL13 humano no glicosilatado, por ejemplo puede ser no más de 10-, 5-, 4-, 3-, 2.5- ó 2 veces diferente como se midió en un ensayo de unión de competencia, un ensayo AMPc, ensayo de liberación de calcio o ensayo de quimiotaxia de células B como es descrito aquí.

Un miembro de unión de la invención puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo una molécula de anticuerpo humano. El miembro de unión normalmente comprende un dominio de anticuerpo VH y/o VL. Los dominios VH y VL de los miembros de unión son también proporcionados como parte de la invención. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están las regiones de determinación de la complementariedad, ("CDR"), y las regiones marco, ("FRs"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio de anticuerpo VH que comprende un VH CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Como alternativa puede o también comprende un dominio de anticuerpo VL que comprende un VL CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Los ejemplos de dominios de anticuerpo VH y VL y CDR de acuerdo con la presente invención son como se relacionan en el listado de secuencia anexo que forma parte de la presente divulgación.

Todas las secuencias VH y VL, secuencias CDR, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y conjuntos de LCDR descritos aquí representan aspectos y realizaciones de la invención. Como es descrito aquí,

un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que otra cosa sea declarada, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Típicamente los miembros de unión de la invención son anticuerpos monoclonales.

Un miembro de unión de la invención puede comprender un sitio de unión al antígeno dentro de una molécula de no anticuerpo, normalmente proporcionada por una o más CDR por ejemplo un conjunto de CDR en una estructura de proteína no anticuerpo, como es discutido adicionalmente a continuación.

Como es descrito con más detalles en los ejemplos, aislamos una molécula de anticuerpo, enumerada anticuerpo 1. El anticuerpo 1, como es descrito aquí, se refiere a anticuerpos con el conjunto de CDR del anticuerpo 1.

Las secuencias para un anticuerpo 1 son mostradas en el Listado de Secuencia anexo, con las siguientes secuencias en el siguiente orden: secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH (SEQ ID NO: 1); secuencia de aminoácidos de dominio VH (SEQ ID NO: 2); secuencia de aminoácidos VH CDR1 (SEQ ID NO: 3); secuencia de aminoácidos VH CDR2 (SEQ ID NO: 4); secuencia de aminoácidos VH CDR3 (SEQ ID NO: 5); secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VL (SEQ ID NO: 6); secuencia de aminoácidos de dominio VL (SEQ ID NO: 7); secuencia de aminoácidos VL CDR1 (SEQ ID NO: 8); secuencia de aminoácidos VL CDR2 (SEQ ID NO: 9); secuencia de aminoácidos VL CDR3 (SEQ ID NO: 10).

Un miembro de unión de la invención puede comprender una o más CDR como es descrito aquí, por ejemplo una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de CDR. La CDR o conjunto de CDR puede ser un CDR o conjunto de CDR del anticuerpo 1, o puede ser una variante del mismo conjunto de como es descrito aquí.

La invención proporciona miembros de unión que comprenden un HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 del anticuerpo 1 y/o un LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de anticuerpo 1 por ejemplo un conjunto de CDR de anticuerpo 1. El miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR VH de anticuerpo 1. Opcionalmente puede también comprender un conjunto de VL CDR de anticuerpo 1, y el VL CDR puede ser el mismo o un anticuerpo diferente que el VH CDR. Un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR del anticuerpo 1, y/o un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR de anticuerpo 1, son también proporcionados por la invención.

Típicamente, un dominio VH es pareado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno anticuerpo, aunque como es discutido adicionalmente a continuación un dominio VH o VL solo puede ser usado para unirse al antígeno. El dominio VH de anticuerpo 1 puede ser pareado con el dominio VL de anticuerpo 1, de manera que un sitio de unión al antígeno anticuerpo es formado comprendiendo ambos dominios VH y VL de anticuerpo 1. En otras realizaciones, el dominio VH de anticuerpo 1 es pareado con un dominio VL distinto del VL de anticuerpo 1. La promiscuidad de la cadena ligera es bien establecida en el arte. De esta forma, el VH de anticuerpo 1 puede ser pareado con el VL de anticuerpo 1 o de otro anticuerpo.

Un miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR H y/o L de anticuerpo 1 con una o más mutaciones de aminoácidos dentro del conjunto de CDR H y/o L descrito. La mutación puede ser una sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos. Así por ejemplo, puede haber hasta 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 mutaciones, por ejemplo sustituciones, dentro del conjunto de CDR H y/o L. Por ejemplo, puede haber una o hasta 5, 4, 3 ó 2 mutaciones, por ejemplo sustituciones en HCDR3 y/o puede haber una o hasta 5, 4, 3 ó 2 mutaciones, por ejemplo sustituciones, en LCDR3.

Un miembro de unión puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene una o más CDR, por ejemplo un conjunto de CDR, dentro de un marco de anticuerpo. Por ejemplo, una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo pueden ser injertados en un marco (por ejemplo un marco humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo. Las regiones marco pueden ser secuencias de segmento de gen de la línea germinal humana. Así, el marco puede ser alineado germinalmente, con lo que uno o más residuos dentro del marco son cambiados para coincidir los residuos en la posición equivalente en el marco de línea germinal humana más similar. Un miembro de unión de la invención puede ser una molécula de anticuerpo humano aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco de línea germinal humana, por ejemplo marco de línea germinal humana, por ejemplo VH3-23 humana. Normalmente el miembro de unión también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo en un marco de línea germinal humana, por ejemplo VK1 L12 humana. Un dominio VH o VL alineado germinalmente puede o no ser alineado germinalmente con uno o más residuos Vernier.

Una molécula de anticuerpo no alineado germinalmente tiene las mismas CDR, pero diferentes marcos, comparado con una molécula de anticuerpo alineada germinalmente. Las secuencias de anticuerpo para el anticuerpo 1 mostradas aquí en el Listado de Secuencias anexo, son alineadas germinalmente. Como es descrito aquí en los ejemplos, la alineación germinal de los dominios VH y VL de anticuerpo 1 según fue aislado incluyó realizar las siguientes mutaciones en el dominio VH: Q1E, V5L, R16G, V23A, G24A, H39Q, G83R y R105Q; y las siguientes mutaciones en el dominio VL: I15V, A58V y D70E. Por lo tanto en un aspecto, un dominio VH de acuerdo con la invención (que incluye un miembro de unión que comprende un dominio VH de este tipo) puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 pero con 1 o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 o las 8, mutaciones VH invertidas anteriores. En una realización, el dominio VH no es sustituido en las posiciones 30, 97 y 98 de SEQ ID NO. 2. De manera similar, un dominio VL de

acuerdo con la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 pero con 1, 2, o las 3 mutaciones VL invertidas anteriores. En una realización, el dominio VL no es sustituido en la posición 2 de SEQ ID NO. 7.

En un aspecto, un miembro de unión de la invención puede comprender (i) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 o la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 con una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en una o más de las regiones marco (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ó 8 sustituciones); y (ii) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 pero con una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en una o más de las regiones marco (por ejemplo 1, 2 ó 3 sustituciones). En una realización de este aspecto, el dominio VH del miembro de unión (por ejemplo IgG) no es sustituido en uno o todas las posiciones 30, 97 y 98 de SEQ ID NO. 2 y el dominio VL no es sustituido en la posición 2 de SEQ ID NO:7. El dominio VH puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 con una o más (por ejemplo 1, 2 o todas) las siguientes sustituciones de aminoácidos: G30S; T97A; R98K. El dominio VL puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 o puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 con la siguiente sustitución de aminoácidos: T2Ile.

Los datos proporcionados aquí para el anticuerpo 1 son mostrados para los formatos alineados germinalmente y/o no alineados germinalmente, y esto es indicado cuando sea apropiado. Por anticuerpo que fue probado en forma alineada germinalmente, datos muy similares fueron obtenidos comparados con la forma no alineada germinalmente.

El codón 3' cgt, y el residuo de Arginina correspondiente, mostrados en la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos para el

dominio VL kappa de anticuerpo 1 fueron incluidos en las secuencias scFv y IgG expresados de este anticuerpo. El residuo de Arginina del terminal C de la secuencia corresponde al residuo 108 de Kabat. El origen de este residuo y su triplete cgt de codificación es explicado a continuación.

Para expresar la cadena ligera de IgG, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo fue proporcionada, que comprende un primer exón que codifica el dominio VL, un segundo exón que codifica el dominio CL, y un intrón que separa el primer exón y el segundo exón. Bajo circunstancias normales, el intrón es empalmado por la maquinaria de procesamiento de ARNm celulares, uniendo el extremo 3' del primer exón al extremo 5' del segundo exón. Así, cuando el ADN que tiene dicha secuencia de nucleótidos fue expresada como RNA, el primer y segundo exones fueron empalmados juntos. La traducción del RNA empalmado produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el dominio CL. Después del empalme, la Arg en el residuo 108 de Kabat es codificada por la última base (c) de la secuencia marco 4 del dominio VL y las primeras dos bases (gt) del dominio CL.

El residuo de Arginina en el residuo 108 de Kabat puede ser considerado que sea el residuo del terminal C del dominio VL de la molécula de anticuerpo.

Un miembro de unión de la invención puede ser uno que compite por la unión a CXCL13 con cualquier miembro de unión que

- (i) se une a CXCL13 y
- (ii) comprende un miembro de unión, dominio VH y/o VL, CDR por ejemplo HCDR3, y/o conjunto de CDR divulgados aquí.

En un aspecto la invención proporciona un miembro de unión que compite para la unión con una molécula scFv de anticuerpo que tiene la SEQ ID NO: 11. La secuencia de SEQ ID NO: 11 corresponde al dominio VH de SEQ ID NO:2 enlazado al dominio VL de SEQ ID

NO:7 mediante una secuencia enlazadora (Gly120 a Ser134). El miembro de unión puede comprender una CDR o conjunto de CDR de anticuerpo 1, o una variante del mismo como es descrito aquí en otro lugar. El miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo por ejemplo un IgG (por ejemplo IgG1) o scFv, como es descrito aquí en otro lugar.

Un miembro de unión puede mostrar una competencia completa o parcial en un ensayo de competencia. Por ejemplo, un miembro de unión puede mostrar al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 ó 100% de competencia para la unión al CXCL13 en un ensayo de competencia, por ejemplo, con una molécula de anticuerpo scFv que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11.

La competencia entre los miembros de unión puede ser ensayada fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o marcando una molécula reportera específica a un miembro de unión que puede ser detectado en presencia de uno o más miembros de unión no marcados, para permitir la identificación de miembros de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo de solapamiento. Tales métodos son rápidamente conocidos por una persona experta en el arte, y son descritos con más detalle aquí. Por ejemplo, un ensayo de competencia del epítipo usando la tecnología TRF-FRET descrita aquí en relación con los ensayos AMP, puede ser usado (un ensayo TRF-FRET de competencia del epítipo), por ejemplo el ensayo HTRF® de competencia del epítipo.

La tecnología HTRF® es como se describe aquí en relación con los ensayos AMP. Un ensayo HTRF® de competencia del epítipo típicamente comprende: mezclar CXCL13 marcados con XL665, anticuerpo de referencia marcado con criptato de europio (por ejemplo una molécula de anticuerpo scFv que tiene SEQ ID NO: 11) y un miembro de unión de prueba; aplicar luz a 337nm (excitando de esta forma el criptato de europio donante); determinar la señal fluorescente a 620nm (donante) y 665nm (aceptor) por TRF; y determinar la relación de señal 665nm/620nm como una medida de la

FRET que ha tenido lugar. Un miembro de unión de prueba, por ejemplo una molécula de anticuerpo IgG o ScFv, que compite con el anticuerpo de referencia para la unión al CXCL13 reduce la FRET que tiene lugar. Un método detallado para este ensayo es proporcionado en los ejemplos.

Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un miembro de unión que comprende un sitio de unión al antígeno anticuerpo humano que compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo especialmente una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y/o VL, CDR por ejemplo HCDR3, o un conjunto de CDR de anticuerpo 1 para la unión al CXCL13.

En aspectos adicionales la presente invención proporciona un miembro de unión que comprende un sitio de unión al antígeno anticuerpo humano que compite con un sitio de unión al antígeno anticuerpo para la unión al CXCL13, donde el sitio de unión al antígeno anticuerpo está compuesto de un dominio VH y un dominio VL, y donde los dominios VH y VL comprenden un conjunto de CDR de anticuerpo 1 divulgados aquí.

Un miembro de unión de la invención puede unirse a un epítipo del CXCL-13 humano donde dicho epítipo incluye al menos un residuo de la secuencia Ile-Leu-Pro-Arg-Gly-Asn-Gly-Cys-Pro-Arg-Lys-Glu (SEQ ID NO: 20) en las posiciones 31-42 de IL-17A madura humana. Este puede por ejemplo unirse a uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco residuos de SEQ ID NO: 20. Un miembro de unión de la invención puede unirse a otras regiones del CXCL-13 humano además de la SEQ ID NO: 20.

Cualquier método adecuado puede ser usado para determinar la secuencia de residuos unidos por un miembro de unión, por ejemplo intercambio hidrógeno-deuterio, mutagénesis dirigida al sitio, espectrometría de masa, NMR y cristalografía de rayos X.

El intercambio hidrógeno amida péptido es una metodología muy bien descrita usada para las proteínas de estudio (Englander, S.W. y otros. Métodos Enzymol. 232:26-42, 1994). Más recientemente este ha sido desarrollado adicionalmente para usar proteínas marcadas con deuterio que se pueden intercambiar por protones y acoplar esto a la espectrometría de masa para medir las tasas de intercambio a través de la proteína completa (Pantazatos, D. y otros. Proc. Natl. Acad. Sci. 101(3):751-756, 2004). Esta tasa de intercambio hidrógeno/deuterio (intercambio H/D) puede ser modificada significativamente por la accesibilidad al solvente de manera que cuando una parte de la proteína está involucrada en la unión a otra molécula la tasa de intercambio disminuirá significativamente. Esta aproximación ha sido usada para mapear las regiones de una proteína involucrada en la interacción con anticuerpos, y fue usada para investigar regiones de CXCL-13 involucradas en los anticuerpos de unión de la invención, como es detallado en el Ejemplo 7 aquí. La espectrometría de masa fue usada en conjunto con el intercambio H/D, para identificar regiones de CXCL-13 humano en contacto con un miembro de unión. Puede ser demostrado por ejemplo que el intercambio H/D para los residuos dentro de SEQ ID NO: 20 es significativamente disminuido cuando el CXCL-13 humano está unido a un miembro de unión de la invención.

En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL de acuerdo con la presente invención, y métodos de preparar un miembro de unión, un dominio VH y/o un dominio VL de la invención, que comprenden expresar dicho ácido nucleico bajo condiciones para provocar la producción de dicho miembro de unión, dominio dominio VH y/o VL, y recuperarlo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia VH CDR o VL CDR divulgada aquí.

Un aspecto adicional proporciona una célula hospedera que contiene o transformada con el ácido nucleico de la invención.

Aspectos adicionales de la presente invención proporcionan composiciones que contienen miembros de unión de la invención, y su uso en métodos de inhibición y/o neutralización de CXCL13, incluyendo los métodos de tratamiento del cuerpo animal o humano mediante terapia.

Los miembros de unión de acuerdo con la invención pueden ser usados en un método de tratamiento o diagnóstico, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en el cuerpo animal o humano (por ejemplo en un paciente humano), que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente invención incluye cualquiera en la que el CXCL13 desempeña una función, como es discutido en detalles aquí en otro lugar.

Estos y otros aspectos de la invención son descritos con más detalles a continuación.

Es conveniente puntualizar aquí que "y/o" donde es usado aquí es tomado como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justo como si cada uno fuera presentado aquí individualmente.

CXCL13

CXCL13 es el ligando 13 de la quimoquina (motivo C-X-C). Una secuencia de CXCL13 humano de longitud completa es depositada bajo el Número de Acceso NP_006410 SEQ ID NO: 12. La secuencia de aminoácidos de longitud completa incluye un péptido N-terminal con 22 residuos el cual es escindido *in vivo* para generar la

forma madura. El CXCL13 maduro tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. El CXCL13 maduro es el antígeno blanco *in vivo* para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, y las referencias aquí al humano CXCL13 son para el CXCL13 maduro a menos que otra cosa sea especificada.

Para algunos ensayos y experimentos descritos aquí, el CXCL13 humano fue expresado en la línea celular MEL. El CXCL13 humano expresado a partir de las células MEL fue truncado en el terminal C, y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 14. Así, la SEQ ID NO: 14 es el CXCL13 humano expresado en MEL como es usado en los ensayos descritos aquí. El CXCL13 no truncado, maduro (SEQ ID NO: 13) pudiera ser también adecuado para usar en los ensayos y no se cree que la truncación afecte los resultados obtenidos.

El CXCL13 humano biotinilado fue usado en algunos de los ensayos descritos aquí. Este CXCL13 fue sintéticamente producido y tiene la secuencia CXCL13 madura SEQ ID NO: 13, que porta biotina en el residuo de lisina más C-terminal.

En algunas realizaciones el CXCL13 puede ser el CXCL13 cinomólogo. Cuando es expresado a partir de células MEL para el trabajo experimental aquí, el CXCL13 cinomólogo fue truncado en el terminal C por 5 aminoácidos y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16.

Una secuencia de CXCL13 cinomólogo maduro no truncado propuesta es la SEQ ID NO 15. Como se muestra la secuencia cino no truncada completa es propuesta para incluir KRKIP en el terminal C como para CXCL13 humano y de mono rhesus. Esto es asumido porque el cebador de rhesus usado para la clonación fue designado para templarlo a la región que es eliminada de CXCL13 maduro humano cuando es truncado.

El CXCL13 no truncado, maduro (SEQ ID NO: 15) podría ser también adecuado para usar en ensayos y la truncación no se cree que afecte los resultados obtenidos.

Como es descrito aquí en otro lugar, el CXCL13 puede ser recombinante, y/o puede ser tanto glicosilatado o no glicosilatado. El CXCL13 glicosilatado y/o no glicosilatado puede ser expresado en sistemas recombinantes, por ejemplo en células de mamíferos tal como líneas celulares humanas, líneas celulares murinas por ejemplo células MEL, o en células de ovario de hámster Chino (CHO).

CXCR5

CXCR5 es el receptor para CXCL13 como es descrito aquí en otro lugar. El CXCR5 humano existe en dos isoformas. Una secuencia de aminoácidos de CXCR5 isoforma 1 es depositada bajo el Número de Acceso NP_001707 y es mostrada aquí como SEQ ID NO: 17. Una secuencia de aminoácidos de CXCR5 isoforma 2 es depositada bajo el Número de Acceso NP_116743 y es mostrada aquí como SEQ ID NO: 18. La isoforma 2 es truncada por 45 aminoácidos en el terminal N. La isoforma 2 por lo tanto carece del codón de iniciación de la traducción y los dominios extracelulares de la variante 1 y no parece unirse al ligando y ser funcional.

La isoforma 1 de CXCR5 humano, que tiene la SEQ ID NO: 17, fue usada en los experimentos aquí. En correspondencia, las referencias aquí a CXCR5 son la isoforma 1 humana a menos que otra cosa sea indicada.

El CXCR5 referido aquí puede ser humano o no humano como es indicado por el contexto. Por ejemplo, en los ensayos de neutralización que usan el CXCL13 humano o el CXCL13 no humano, el CXCR5 de una especie apropiada puede ser seleccionado. Una especie apropiada puede ser CXCR5 humano o no humano donde la pareja de unión es el CXCL13 humano o no humano de la misma especie. Como alternativa, el CXCL13 humano o no humano puede ser

usado en ensayos con el CXCR5 humano o no humano de una especie diferente donde el CXCL13 humano o no humano es conocido para la reacción cruzada.

Miembro de unión

Este describe un miembro de un par de moléculas que se unen unas a otras. Los miembros de un par de unión pueden ser naturalmente derivados o completamente o parcialmente sintéticamente producidos. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a y es por lo tanto complementaria para una organización polar y espacial particular del otro miembro del par de moléculas. Los ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, receptor hormona-hormona, receptor-ligando, y enzima-sustrato. La presente invención se relaciona con las reacciones tipo antígeno-anticuerpo.

Un miembro de unión normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína no anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno.

Un sitio de unión al antígeno puede ser proporcionado por medio del arreglo de las CDR en las estructuras de proteína no anticuerpo, tal como la fibronectina o la citocroma B etc. [2, 3, 4], o por aleatorización o mutación de los residuos de aminoácidos de un lazo dentro de una estructura de proteína para conferir especificidad de unión para un blanco deseado. Las estructuras para manipular nuevos sitios de unión en las proteínas han sido revisadas en detalles por Nygren y otros. [4]. Las estructuras de las proteínas para los miméticos de anticuerpos son divulgadas en WO/0034784, la que es incorporada aquí como referencia en su totalidad, en la que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un lazo aleatorizado. Una estructura adecuada en la cual injertar una o más CDR, por

ejemplo un conjunto de HCDR, puede ser proporcionada por cualquier miembro de dominio de la superfamilia del gen de la inmunoglobulina. La estructura puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de una estructura de proteína no anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula estructura que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpos. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tal como una capacidad de entrar células, penetrar profundo en los tejidos o alcanzar blancos dentro de otras estructuras, o para unirse dentro de las cavidades de la proteína del antígeno blanco. El uso de sitios de unión al antígeno en la estructura de las proteínas no anticuerpo es revisado en Wess, 2004 [5]. Típicas son las proteínas que tienen una columna vertebral estable y uno o más lazos variables, en las que la secuencia de aminoácidos del lazo o lazos es específicamente o aleatoriamente mutada para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno blanco. Tales proteínas incluyen los dominios de unión IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo 10mo dominio de la fibronectina tipo III), lipocalinas así como estructuras gamma cristalinas y otras Affilin™ (Scil Proteínas). Los ejemplos de otras aproximaciones incluyen "Microcuerpos" sintéticos basados en ciclotidos - pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramolecular, Microproteínas (Versacuerpos™, Amunix) y proteínas de repetición de anquirina (DARPin, Molecular Partners).

Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo formar un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión de la invención pueden conducir a una etiqueta detectable, o pueden ser conjugados a una toxina o una mitad o enzima blanco (por ejemplo

a través de un enlazador o enlace peptídico). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo en un dominio de enzima) así como un sitio de unión al antígeno, donde el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y así dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo por escisión.

Aunque, como se nota, las CDR pueden ser conducidas por estructuras no anticuerpo, la estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR de la invención generalmente será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma en la que la CDR o conjunto de CDR está localizado en una posición correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL de aparición natural codificados por los genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de la inmunoglobulina pueden ser determinados con referencia a Kabat, y otros, 1987 [6] y las actualizaciones de los mismos. Un número de recursos académicos y comerciales on-line están disponibles para para interrogar esta base de datos. Por ejemplo, ver ref. [7] y el recurso on-line asociado, actualmente en la dirección web de <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Por región CDR o CDRs, se entiende que indica las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina como es definido por Kabat y otros. 1991 [8], y ediciones posteriores. Un anticuerpo típicamente contiene 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR o CDRs es usado aquí para indicar, de acuerdo al caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo al antígeno o el epítipo que lo reconoce.

Entre las seis secuencias CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene un tamaño de variabilidad mayor (mayor diversidad esencialmente debida a los mecanismos de reordenamiento de los genes que la provoca). Estas pueden ser tan cortas como 2 aminoácidos aunque el tamaño más largo conocido es 26. La longitud de la CDR también puede variar de acuerdo con la longitud que puede ser acomodada por el marco particular subyacente. Funcionalmente, el HCDR3 desempeña una función en parte en la Determinación de la especificidad del anticuerpo [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Molécula de anticuerpo

Esta describe una inmunoglobulina natural o producida parcialmente o completamente de manera sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión al antígeno anticuerpo. Debe ser entendido aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir estos no están en su ambiente natural pero estos pueden haber sido capaces de ser aislados u obtenidos por purificación a partir de fuentes naturales, o también obtenidos por recombinación genética, o por síntesis química, y estos pueden entonces contener aminoácidos no naturales como será descrito posteriormente. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, las moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd. Varias otras moléculas de anticuerpos que incluyen uno o más sitios de unión al antígeno anticuerpo han sido manipuladas, incluyendo por ejemplo Fab₂, Fab₃, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. Las moléculas de anticuerpos y los métodos para su construcción y uso son descritos en [17].

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno blanco. Tales técnicas pueden incluir la introducción de ADN que

codifica la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más las regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un gran cuerpo de literatura posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede ser sometida a una mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Como los anticuerpos pueden ser modificados en un número de formas, el término "molécula de anticuerpo" debe ser construido como cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión al antígeno anticuerpo con la especificidad y/o la unión al antígeno requeridas. Así, este término cubre fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno anticuerpo, ya sea natural o completamente o parcialmente sintéticos. Las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión al antígeno anticuerpo, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido (por ejemplo derivado de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo) son por lo tanto incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos son descritas en EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un gran cuerpo de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en el arte de la ingeniería de los anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, los hibridomas humanos pueden ser hechos como es descrito por Kontermann & Dubel [18]. La exhibición de fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión ha sido descrita en detalles en muchas publicaciones, tal como Kontermann & Dubel [18] y WO92/01047 (discutido adicionalmente a continuación), y las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404.

Ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón son inactivados y funcionalmente reemplazados con genes de anticuerpo humanos mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmune del ratón, pueden ser usados para aislar los anticuerpos humanos [19]. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos usando técnicas conocidas en el arte tal como aquellas divulgadas en por ejemplo WO91/09967, US 5,585,089, EP592106, US 565,332 y WO93/17105. Además, WO2004/006955 describe métodos para humanizar anticuerpos, basados en la selección de secuencias marco de región variable a partir de genes de anticuerpo humano comparando los tipos de estructura de las CDR canónicas para secuencias CDR de la región variable de un anticuerpo no humano a tipos de estructura de las CDR canónicas para las CDR correspondientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal. Las regiones variables de anticuerpo humano que tienen tipos de estructura de las CDR canónicas similares a las CDR no humanas forman un subconjunto de secuencias de anticuerpo humano miembros a partir del cual seleccionar secuencias marco humanas. Los miembros del subconjunto pueden ser además clasificados por la similitud de aminoácidos entre las secuencias CDR humana y no humana. En el método de WO2004/006955, las secuencias humanas de más alta clasificación son seleccionadas para proporcionar las secuencias marco para construir un anticuerpo quimérico que reemplaza funcionalmente las secuencias CDR humanas con la CDR contraparte no humana usando el marco humano miembro del subconjunto seleccionado, con lo que se proporciona un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar las secuencias marco entre los anticuerpos humanos y no humanos. Los anticuerpos quiméricos hechos de acuerdo con el método son también divulgados.

Las moléculas de anticuerpos sintéticas pueden ser creadas por la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ordenados dentro de vectores de expresión

adecuados, por ejemplo como es descrito por Knappik y otros. [20] o Krebs y otros. [21].

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo simple; (iv) el fragmento dAb [22, 23, 24], que consiste en un dominio VH o un VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL son enlazados por un enlazador peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión al antígeno [25, 26]; (viii) dímeros Fv de cadena simple biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión de genes (WO94/13804; [27]). Las moléculas Fv, scFv o de diacuerpo pueden ser estabilizadas por la incorporación de puentes de disulfuro que enlaza los dominios VH y VL [28]. Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también pueden ser hechos [29]. Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', el cual difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxil del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, el cual es un fragmento Fab' en el cual el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser obtenidos comenzando a partir de la molécula de anticuerpo 1, por métodos tales como la digestión por enzimas por ejemplo pepsina o papaina y/o por escisión de los puentes de disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden ser obtenidos por

técnicas de recombinación genética asimismo bien conocidas por las personas expertas en el arte o también por síntesis peptídica por medio de, por ejemplo, sintetizadores peptídicos automáticos, tal como aquellos suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc., o por síntesis y expresión de ácido nucleico.

Los fragmentos de anticuerpo funcionales de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya vida media es aumentada por una modificación química, especialmente por PEGylación, o por incorporación en un liposoma.

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento pequeño de unión al antígeno monomérico de un anticuerpo, a saber la región variable de un anticuerpo de cadena pesada o ligera [24]. VH dAb existe naturalmente en camélidos (por ejemplo camello, llama) y pueden ser producidos inmunizando un camélido con un antígeno blanco, aislando las células B específicas al antígeno y clonando directamente los genes dAb a partir de células B individuales. Los dAb son también producidos en cultivos celulares. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad de temperatura los hace particularmente fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración por afinidad. Los VH dAb de camélidos están siendo desarrollados para uso terapéutico bajo el nombre de "nanocuerposTM". Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como es establecido aquí, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como es establecido aquí.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los cuales dos regiones variables diferentes son combinadas en la misma molécula [30]. Su uso ha sido demostrado en el campo del diagnóstico y en el campo de la terapia a partir de su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para dirigir varias moléculas en la superficie de las células tumorales. Cuando los anticuerpos biespecíficos son usados, estos pueden ser anticuerpos

biespecíficos convencionales, los cuales pueden ser fabricados en una variedad de formas [31], por ejemplo preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden ser obtenidos por métodos químicos [32, 33] o métodos somáticos [34, 35] pero asimismo y preferiblemente por técnicas de ingeniería genética los cuales permiten forzar la heterodimerización y así facilitar los procesos de purificación del anticuerpo buscado [36]. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de la tecnología BiTE™ en los que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad pueden ser usados y directamente enlazados a través de péptidos flexibles cortos. Este combina dos anticuerpos en una cadena de polipéptido simple corta. Los diacuerpos y scFv pueden ser contruidos sin una región Fc, usando solamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica.

Los anticuerpos biespecíficos pueden ser contruidos como IgG enteros, como Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o también como scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos pueden ser enlazados usando métodos de rutina conocidos en el arte para formar anticuerpos tetravalentes.

Los diacuerpos biespecíficos, en oposición a los anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser también particularmente útiles ya que estos pueden ser rápidamente contruidos y expresados en E.coli. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como los fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiada pueden ser rápidamente seleccionados usando la exhibición de fagos (W094/13804) de las bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo es mantenido constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el CXCL13, entonces una biblioteca puede ser hecha cuando es variado el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de apropiada especificidad. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden ser hechos por

métodos de ingeniería alternativos como es descrito en Ridgeway y otros, 1996 [37].

Varios métodos están disponibles en el arte para obtener anticuerpos contra el CXCL13. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que puede ser obtenido de acuerdo con los métodos estándares bien conocidos por la persona experta en el arte.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que son descritas en particular en el manual "Anticuerpos" [38] o a la técnica de preparación a partir de los hibridomas descrita por Köhler y Milstein [39].

Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos, por ejemplo, de una célula animal inmunizada contra el CXCL13, o uno de sus fragmentos conteniendo el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. Los fragmentos adecuados y péptidos o polipéptidos que los comprenden son descritos aquí, y pueden ser usados para inmunizar los animales para generar anticuerpos contra el CXCL13. Dicho CXCL13, o uno de sus fragmentos, pueden ser especialmente producidos de acuerdo con los métodos de trabajo usuales, por recombinación genética comenzando con una secuencia de ácido nucleico contenido en la secuencia ADNc que codifica para el CXCL13 o fragmento del mismo, por síntesis peptídica comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia péptido de CXCL13 y/o fragmento del mismo.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser, por ejemplo, purificados en una columna de afinidad en la cual el CXCL13 o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, han sido previamente inmovilizados. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales pueden ser

purificados por cromatografía en la proteína A y/o G, seguido o no por cromatografía de intercambio iónico dirigida a eliminar los contaminantes de la proteína residual así como el ADN y el LPS, en sí mismo, seguido o no por la cromatografía de exclusión en gel de Sefarosa para eliminar los potenciales agregados debidos a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una realización, la totalidad de esas técnicas pueden ser usadas simultáneamente o sucesivamente.

Sitio de unión al antígeno

Este describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno blanco. En una molécula de anticuerpo este es referido como el sitio de unión al antígeno anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno blanco. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede solamente unirse a una parte particular del antígeno, dicha parte es denominada un epítipo. Un sitio de unión al antígeno anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión al antígeno anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo y una una región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo.

Aislado

Este se refiere al estado en el cual los miembros de unión de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, estarán generalmente de acuerdo con la presente invención. Así, los miembros de unión, los dominios VH y/o VL, y los vectores y moléculas de ácido nucleico que codifican de acuerdo con la presente invención pueden ser proporcionados aislados y/o purificados, por ejemplo a partir de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origine distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido

nucleico aislado estará libre o sustancialmente libre de material con el cual estos están naturalmente asociados, tal como otros polipéptidos o ácido nucleicos con los cuales estos se encuentran en su ambiente natural, o el ambiente en el cual estos son preparados (por ejemplo cultivo celular) cuando tal preparación es por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico pueden ser formulados con diluentes o adyuvantes y aún con propósitos prácticos ser aislados - por ejemplo los miembros serán normalmente mezclados con gelatina u otros portadores si se usan para recubrir placas de microtítulo para usar en inmunoensayos, o serán mezclados con portadores o diluentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión pueden ser glicosilatados, naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterológicas (por ejemplo células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden ser (por ejemplo si se producen por expresión en una célula procariota) no glicosilatados.

Las preparaciones heterológicas que comprenden moléculas de anticuerpos anti-CXCL13 también forman parte de la invención. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadena pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina en el terminal C, con varios grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivados, tal como ciclización de un ácido glutámico en el terminal N para formar un residuo de ácido piroglutámico.

Como es usada aquí, la frase "sustancialmente como es establecido" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos aquí serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas de las cuales la secuencia es establecida aquí. Como es descrito aquí, la frase "muy similar" con respecto a la(s) región(s) especificada(s) de uno o más dominios variables, es contemplada que desde 1 a alrededor de 5, por ejemplo desde 1 a 4, incluyendo

1 a 3, ó 1 ó 2, ó 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos pueden ser hechas en la CDR y/o dominio VH o VL.

Descripción Detallada de la Invención

Como se notó anteriormente, un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se une al CXCL13 y puede neutralizar una actividad biológica de CXCL13. Un miembro de unión de la presente invención puede ser sometido a la optimización de potencia, para mejorar adicionalmente su potencia de neutralización.

Generalmente, la optimización de potencia involucra la mutación de la secuencia de un miembro de unión seleccionado (normalmente la secuencia de dominio variable de un anticuerpo) para generar una biblioteca de miembros de unión, que son entonces ensayados para la potencia y los miembros de unión más potentes son seleccionados. Así los miembros de unión "optimizados en potencia" seleccionados tienden a tener una mayor potencia que el miembro de unión del cual la biblioteca fue generada.

Sin embargo, los miembros de unión de alta potencia pueden ser obtenidos sin optimización. Como es demostrado aquí, los miembros de unión de alta potencia pueden ser obtenidos directamente a partir de una selección inicial por ejemplo un ensayo de neutralización bioquímico.

Un miembro de unión "optimizado en potencia" se refiere a un miembro de unión con una potencia de neutralización optimizada de una actividad particular o función aguas abajo de CXCL13. Los ensayos y potencias son descritos con más detalle aquí en otro lugar.

Los miembros de unión optimizados en potencia y no optimizados son aspectos de la invención, así como los métodos para la optimización de potencia de un miembro de unión seleccionado. La presente invención así permite a la persona experta generar miembros de unión que tienen alta potencia.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de obtener uno o más miembros de unión capaces de unirse al antígeno, el método incluyendo poner en contacto una biblioteca de miembros de unión de acuerdo con la invención y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión de la biblioteca capaces de unirse a dicho antígeno.

La biblioteca puede ser exhibida en partículas o complejos moleculares, por ejemplo paquetes genéticos replicables, tales como partículas de levadura, bacterias o bacteriófago (por ejemplo T7), virus, células o sistemas de exhibición *in vitro* covalentes, ribosomales o de otro tipo, cada partícula o complejo molecular que contiene el ácido nucleico codifica el dominio variable VH del anticuerpo exhibido en este, y opcionalmente también un dominio VL exhibido si está presente. La exhibición de fagos es descrita en WO92/01047 y por ejemplo las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404, cada una de las cuales es incorporada aquí como referencia en su totalidad.

A continuación de la selección de miembros de unión capaces de unirse al antígeno y exhibidos en bacteriófagos u otros complejos moleculares o partículas de la biblioteca, el ácido nucleico puede ser tomado de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que exhibe dicho miembro de unión seleccionado. Tal ácido nucleico puede ser usado en la producción posterior de un miembro de unión o un dominio variable VH o VL de anticuerpo por la expresión del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que exhibe dicho miembro de unión seleccionado.

Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho miembro de unión seleccionado puede ser proporcionado en forma

aislada, como puede un miembro de unión que comprende un dominio VH de este tipo.

La capacidad de unirse al CXCL13 puede ser probada adicionalmente, también la capacidad para competir con un miembro de unión por ejemplo un anticuerpo 1, (por ejemplo en formato scFv y/o formato IgG, por ejemplo IgG1) para la unión al CXCL13 puede ser determinada. La capacidad de neutralizar el CXCL13 puede ser probada, como es discutido adicionalmente aquí en otro lugar.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede unirse al CXCL13 con la afinidad del anticuerpo 1, por ejemplo scFv o IgG1, o con una afinidad que es mejor.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede neutralizar una actividad biológica de CXCL13 con la potencia del anticuerpo 1, por ejemplo scFv, o IgG1, o con una potencia que es mejor.

La afinidad de unión y la potencia de neutralización de los diferentes miembros de unión puede ser comparada bajo condiciones apropiadas.

Las variantes de los dominios VH y VL y CDR de la presente invención, incluyendo aquellos para los que las secuencias de aminoácidos son establecidas aquí, y que pueden ser empleados en los miembros de unión para el CXCL13 pueden ser obtenidos por medio de métodos de mutación o alteración de secuencias y selección para miembros de unión al antígeno con características deseadas. Los ejemplos de características deseadas incluyen pero no están limitados a:

- Afinidad de unión aumentada para el antígeno en relación a los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno

- Neutralización de una actividad del antígeno aumentada en relación a los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si la actividad es conocida
- Capacidad competitiva especificada con un anticuerpo conocidos o ligando al antígeno a proporciones molares específicas
- Capacidad para inmunoprecipitar el complejo
- Capacidad para unirse a un epítipo especificado
 - o Epítipo lineal, por ejemplo secuencia peptídica identificada usando exploración de unión al péptido como es descrito aquí, por ejemplo usando péptidos seleccionados en conformación lineal y/u obligada
 - o Epítipo conformacional, formado por residuos no continuos
- Capacidad para modular una nueva actividad biológica de CXCL13, o la molécula aguas abajo.

Tales métodos son también proporcionados aquí.

Las variantes de moléculas de anticuerpos divulgados aquí pueden ser producidas y usadas en la presente invención. Siguiendo la conducción de la química computacional aplicando las técnicas de análisis de datos multivariantes a las relaciones estructura/propiedad-actividad [40] cuantitativas, las relaciones actividad-propiedad de los anticuerpos pueden ser derivadas usando técnicas matemáticas bien conocidas, tal como regresión estadística, reconocimiento de patrón y clasificación [41, 42, 43, 44, 45, 46]. Las propiedades de los anticuerpos pueden ser derivadas de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de probabilidad de residuos de contacto o propiedad fisicoquímica calculada) de la secuencia de anticuerpo, estructuras funcionales y tridimensionales y estas propiedades pueden ser consideradas singularmente y en combinación.

Un sitio de unión al antígeno anticuerpo compuesto por un dominio VH y un dominio VL está típicamente formado por seis lazos de polipéptidos: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y

tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha aclarado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación del anticuerpo [47,48]. Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (lazo) en los dominios VH, los lazos del sitio de unión tienen un número pequeño de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. La estructura canónica formada en un lazo particular ha sido mostrada para ser determinada por su tamaño y la presencia de algunos residuos en sitios claves en el lazo y en las regiones marco [47, 48].

Este estudio de la relación secuencia-estructura puede ser usado para predecir aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes para mantener la estructura tridimensional de sus lazos CDR y por tanto mantener la especificidad de unión. Estas predicciones pueden ser sustentadas por la comparación de las predicciones en el rendimiento de los experimentos de optimización conducidos. En una aproximación estructural, puede ser creado un modelo de la molécula de anticuerpo [49] usando cualquier paquete comercial o libremente disponible, tal como WAM [50]. Una visualización de proteínas y paquetes de software de análisis, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View [51] pueden entonces ser usados para evaluar las posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información puede entonces ser usada para hacer las sustituciones probablemente para tener un efecto beneficioso o mínimo en la actividad.

Las técnicas requeridas para hacer las sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos CDR, dominios VH o VL de anticuerpo y miembros de unión generalmente están disponibles en el arte. Las variantes de secuencias pueden ser hechas, con sustituciones que pueden o no ser predichas de tener un efecto beneficioso o mínimo en la actividad, y probadas para la capacidad de unirse

y/o neutralizar el CXCL13 y/o para cualquier otra propiedad deseada.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias son específicamente divulgadas aquí pueden ser empleadas de acuerdo con la presente invención, como se discutió.

Un aspecto adicional de la invención es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de anticuerpo VH 1 mostrado en el Listado de Secuencia anexo, y/o que comprende un dominio VL que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de anticuerpo VL 1 mostrado en the Listado de Secuencia anexo. Los algoritmos que pueden ser usados para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen por ejemplo BLAST [52], FASTA [53], o el algoritmo Smith-Aguaman [54], por ejemplo empleando parámetros por defecto.

Las variantes de dominios VH, dominios VL y/o CDR o conjuntos de CDR particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, eliminación, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácidos). Las variantes pueden incluir menos de alrededor de 20 alteraciones, tal como menos de alrededor de 15, menos de alrededor de 10 o menos de alrededor de 5 alteraciones, por ejemplo 5, 4, 3, 2 ó 1.

Las alteraciones pueden ser hechas en una o más regiones marco y/o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no resultan en pérdidas de función, de manera que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede conservar una capacidad para unirse y/o neutralizar el CXCL13. Este puede conservar la misma capacidad de neutralización y/o de unión cuantitativa como un miembro de unión en el que no se hace

la alteración, por ejemplo como se midió en un ensayo descrito aquí. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede tener una capacidad mejorada para unirse y/o neutralizar el CXCL13.

La alteración puede comprender el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos con un aminoácido que no existe de manera natural o no estándar, modificando uno o más residuos de aminoácidos que no existen de manera natural o en forma no estándar, o insertar uno o más aminoácidos que no existen de manera natural o no estándar en la secuencia. Los ejemplos de números y posiciones de alteraciones en las secuencias de la invención son descritos aquí en otro lugar. Los aminoácidos que no existen de manera natural incluyen los 20 L-aminoácidos "estándares" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos de letra simple estándares. Los aminoácidos no estándares incluyen cualquier otro residuo que puede ser incorporado en una columna de polipéptido o resultar de la modificación de un residuo de aminoácidos existente. Los aminoácidos no estándares pueden existir de manera natural o existir de manera no natural. Muchos aminoácidos no estándares que existen de manera natural son conocidos en el arte, tal como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, N-acetilserina, etc. [55]. Aquellos residuos de aminoácidos que son derivados en su posición N-alfa serán solamente localizados en el terminal N de una secuencia de aminoácidos. Normalmente en la presente invención un aminoácido es un L-aminoácido, pero puede ser un D-aminoácido. La alteración puede por lo tanto comprender modificar un L-aminoácido en, o reemplazarlo con, un D-aminoácido. Las formas de aminoácidos metilada, acetilada y/o fosforilada de aminoácidos son también conocidas, y los aminoácidos en la presente invención pueden ser sometidos a tal modificación.

Las secuencias de aminoácidos en dominios de anticuerpo y miembros de unión de la invención pueden comprender aminoácidos no naturales o no estándares descritos anteriormente. Los

aminoácidos no estándares (por ejemplo D-aminoácidos) pueden ser incorporados en una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, o por modificación o reemplazo de los aminoácidos estándares "originales" después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos.

El uso de aminoácidos no estándares y/o que no existen de manera natural aumenta la diversidad estructural y funcional, y puede así aumentar el potencial para alcanzar la unión al CXCL13 deseada y neutralizar las propiedades en un miembro de unión de la invención. Adicionalmente, ha sido demostrado que los D-aminoácidos y análogos tienen diferentes perfiles farmacocinéticos comparado con los L-aminoácidos estándares, a causa de la degradación *in vivo* de polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal por ejemplo un humano, lo que significa que los D-aminoácidos son ventajosos para algunas aplicaciones *in vivo*.

Las nuevas regiones VH o VL que portan las secuencias derivadas de las CDR de la invención pueden ser generadas usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar las mutaciones dentro del dominio variable entero. Una técnica de este tipo es descrita por Gram y otros. [56], la que usó PCR propenso a error. En algunas realizaciones uno o dos sustituciones de aminoácidos son realizadas dentro de un dominio variable entero o conjunto de CDR.

Otro método que puede ser usado es la mutagénesis dirigida a las regiones CDR de los genes VH o VL. Tales técnicas son divulgadas por Barbas y otros. [57] y Schier y otros. [58].

Todas las técnicas descritas anteriormente son conocidas como tal en el arte y la persona experta será capaz de usar tales técnicas para proporcionar miembros de unión de la invención usando metodología de rutina en el arte.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para obtener un sitio de unión al antígeno anticuerpo para el CXCL13, el método comprende proporcionar a modo de adición, la eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH establecido aquí, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, opcionalmente combinando el dominio VH así proporcionado con uno o más dominio VL, y probar el dominio VH o combinación o combinaciones VH/VL para identificar un miembro de unión o un sitio de unión al antígeno anticuerpo para el CXCL13 y opcionalmente con una o más propiedades deseadas, por ejemplo capacidad para neutralizar la actividad de CXCL13. Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como es establecida aquí. Un método análogo puede ser empleado en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL divulgada aquí son combinadas con uno o más dominios VH.

Como fue notado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente como es establecido aquí pueden ser portadas como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias HCDR3 sustancialmente como es establecido aquí representan realizaciones de la presente invención y cada una de estas pueden ser portadas como un HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana o una porción sustancial del mismo.

Los dominios variables empleados en la invención pueden ser obtenidos o derivados de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso o actuales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivarse de un anticuerpo no humano. Una secuencia CDR de la invención (por ejemplo CDR3) puede ser introducida en un repertorio de dominios variables que carece de una CDR (por ejemplo CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y otros

[59] describen métodos de producir repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que los cebadores de consenso dirigidos al o adyacentes al terminal 5' del área de dominio variable son usados en conjunto con cebadores de consenso a la tercera región marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks y otros describen además como este repertorio puede ser combinado con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden ser intercambiadas con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos intercambiados combinados con un dominio VH o VL cognado para proporcionar miembros de unión de la invención. El repertorio puede entonces ser exhibido en un sistema hospedero adecuado, tal como el sistema de exhibición de fagos de WO92/01047, el que es incorporado aquí como referencia en su totalidad, o cualquier cuerpo de literatura posterior, incluyendo Kay, Winter & McCafferty [60], de manera que los miembros de unión adecuados pueden ser seleccionados. Un repertorio puede constar de cualquier cosa desde 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros o más. Otros sistemas hospederos adecuados incluyen, pero no están limitados a exhibición de levadura, exhibición de bacterias, exhibición de T7, exhibición de virus, exhibición de células, exhibición de ribosoma y exhibición covalente.

Un método de preparar un miembro de unión para el antígeno de CXCL13 es proporcionado, dicho método comprende:

- (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifica un dominio VH que incluye una CDR3 a ser reemplazada o que carece de una región de codificación de CDR3;
- (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como es establecida aquí para una VH CDR3 de manera que dicho ácido nucleico donante es insertado en la región CDR3 en el

repertorio, como para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifica un dominio VH;

- (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
- (d) seleccionar un miembro de unión para el CXCL13; y
- (e) recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico que lo codifica.

Nuevamente, un método análogo puede ser empleado en el cual una VL CDR3 de la invención es combinada con un repertorio de ácidos nucleicos que codifica un dominio VL que incluye una CDR3 a ser reemplazada o que carece de una región de codificación de CDR3.

De manera similar, uno o más, o las tres CDR pueden ser injertadas en un repertorio de dominios VH o VL que son entonces seleccionados para un miembro de unión o miembros de unión para el CXCL13.

Por ejemplo, uno o más de anticuerpo 1 HCDR1, HCDR2 y HCDR3 o el conjunto de HCDR del anticuerpo 1 pueden ser empleados, y/o uno o más de anticuerpo 1 LCDR1, LCDR2 y LCDR3 o el conjunto de LCDR de anticuerpo 1 pueden ser empleados.

De manera similar, otros dominios VH y VL, conjunto de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR divulgados aquí pueden ser empleados.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. La porción puede también incluir al menos alrededor de 50 % de cualquiera o ambas de la primera y cuarta regiones marco, el 50 % siendo el 50 % del terminal C de la primera región marco y el 50 % del terminal N de la cuarta región marco. Los residuos adicionales en el extremo del terminal N o terminal C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente no asociados con regiones de dominio

variable que no existen de manera natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión de la presente invención realizada por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de manipulación. Otros pasos de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir los dominios variables de la invención a secuencias de proteína adicionales que incluyen regiones constantes de anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas detectables/funcionales como es discutido en más detalle aquí en otro lugar.

Aunque en algunos aspectos de la invención, los miembros de unión comprenden un par de dominios VH y VL, dominios de unión simples basados en cualquiera de las secuencias de dominio VH o VL forman aspectos adicionales de la invención. Es conocido que los dominios simples de inmunoglobulina, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a los antígenos blanco de una manera específica. Por ejemplo, ver la discusión de dAb anterior.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión simples, estos dominios pueden ser usados para seleccionar los dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaces de unirse al CXCL13. Esto pueden ser logrado por los métodos de selección para la exhibición de fagos usando la llamada aproximación combinatoria dual jerárquica como es divulgado en WO92/01047, incorporada aquí como referencia en su totalidad, en la cual una colonia individual conteniendo un clon de la cadena H o cadena L es usado para infectar una biblioteca de clones completa que codifica la otra cadena (L o H) y el miembro de unión resultante de dos cadenas es seleccionado de acuerdo con las técnicas de exhibición de fagos, tal como aquellas descritas en esa referencia. Esta técnica es también divulgada en Marks y otros, *ibid.*

66

Los miembros de unión de la presente invención pueden además comprender regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo del terminal C a los dominios constantes de cadena ligera del anticuerpo incluyendo las cadenas C κ o C λ humanas. De manera similar, un miembro de unión basado en un dominio VH puede estar unido en su extremo del terminal C a todo o parte (por ejemplo un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgG, IgA, IgE y IgM y cualquiera de las sub-clases de isotipos, particularmente IgG1 y IgG4. IgG1 es ventajoso, debido a su función efectora y fácil fabricación. Cualquier variante de región constante sintética o de otro tipo que tenga esas propiedades y establezca las regiones variables también puede ser útil en la presente invención.

Los miembros de unión de la invención pueden ser marcados con una etiqueta detectable o funcional. Así, un miembro de unión o molécula de anticuerpo puede estar presente en forma de un inmunoconjugado de manera de obtener una señal detectable y/o cuantificable. Un inmunoconjugado puede comprender una molécula de anticuerpo de la invención conjugada con una etiqueta detectable o funcional. Una etiqueta puede ser cualquier molécula que produce o puede ser inducida a producir una señal, incluyendo pero no limitado a fluorocromos, radioetiquetas, enzimas, quimioluminiscentes o fotosintetizadores. Así, la unión puede ser detectada y/o medida mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz.

Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación,

- enzimas, tal como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa,

losozima, malato dehidrogenasa y peroxidasa por ejemplo peroxidasa de rábano;

- colorantes;
- etiquetas fluorescentes o fluorescedores, tal como fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, compuestos de rodamina y derivados, GFP (GFP por "Green Fluorescent Protein"), dansyl, umbelliferona, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina; fluoróforos tal como lantánido criptatos y quelatos por ejemplo Europio etc. (Perkin Elmer y Cis Biointernational),
- etiquetas quimioluminiscentes o quimioluminizadores, tal como isoluminol, luminol y los dioxetanos;
- etiquetas bioluminescentes, tales como luciferasa y luciferina;
- sensibilizadores;
- coenzimas;
- sustratos de enzima;
- radioetiquetas incluyendo pero no limitado a bromo77, carbono14, cobalto57, fluor8, galio67, galio 68, hidrógeno3 (tritio), indio111, indio 113m, yodo123m, yodo125, yodo126, yodo131, yodo133, mercurio107, mercurio203, fósforo32, renio99m, renio101, renio105, rutenio95, rutenio97, rutenio103 , rutenio105, escandio47, selenio75, azufre35, tecnecio99, tecnecio99m, telurio121m, telurio122m, telurio125m, tulio165, tulio167, tulio168, itrio199 y otras radioetiquetas mencionadas aquí;
- partículas, tal como látex o partículas de carbono; metal sol; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden ser adicionalmente marcadas con un colorante, catalizador u otro grupo detectable;
- moléculas tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina;
- mitades toxinas, tal como por ejemplo una mitad toxina seleccionada de un grupo de Pseudomonas exotoxina (PE o un fragmento citotóxico o mutante del mismo), toxina Difteria o un fragmento citotóxico o mutante de la misma, una toxina botulina

68

A, B, C, D, E o F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma por ejemplo ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antiviral de fitolaca o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

Las enzimas y coenzimas adecuadas son divulgadas en Litman, y otros, US4275149, y Boguslaski, y otros, US4318980, cada una de ellas son incorporadas aquí como referencia en su totalidad. Los fluoroscedores y quimioluminiscentes adecuados son divulgados en Litman, y otros, US4275149, que es incorporada aquí como referencia en su totalidad. Las etiquetas incluyen además mitades químicas, tal como biotina que pueden ser detectadas a través de la unión a una mitad detectable cognada específica, por ejemplo avidina o estreptavidinaa marcadas. Las etiquetas detectables pueden ser unidas a los anticuerpos de la invención usando la química convencional conocida en el arte.

Los inmunoconjugados o sus fragmentos funcionales pueden ser preparados por métodos conocidos por la persona experta en el arte. Estos pueden ser acoplados a las enzimas o a etiquetas fluorescentes directamente o por intermedio de un grupo espaciador o de un grupo de enlace, tal como un polialdehído, como glutaraldehído, ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), ácido dietileno-triaminapentaacético (DTPA), o en presencia de agentes de acoplamiento, tal como aquellos mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen etiquetas de tipo fluoresceína pueden ser preparados por reacción con un isotiocianato.

Los métodos conocidos por la persona experta en el arte existentes para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos directamente o a través de un agente quelatante, tales como EDTA, DTPA mencionados anteriormente pueden ser usados para los radioelementos que pueden ser usados en diagnóstico. Es asimismo posible realizar el marcado con sodio125 por el método

de la cloramina T [61] o también con tecnecio^{99m} por la técnica de Crockford y otros, (US4424200, aquí incorporada como referencia en su totalidad) o unido a través de DTPA como es descrito por Hnatowich (US4479930, aquí incorporada como referencia en su totalidad).

Existen numerosos métodos mediante los cuales la etiqueta puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor, y reactivos químicos. La etiqueta también puede unirse a otro miembro de unión que se une al anticuerpo de la invención, o a un soporte.

La etiqueta directamente puede producir una señal, y por lo tanto, los componentes adicionales no son requeridos para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo fluorescentes, son capaces de absorber luz visible y ultravioleta, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida es luego disipada por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Esta segunda emisión de longitud de onda también puede transferir energía a una molécula aceptora marcada, y la energía resultante disipada desde la molécula aceptora mediante emisión de luz por ejemplo transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Otras etiquetas que directamente producen una señal incluyen isótopos radioactivos y colorantes.

De forma alterna, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema que produce la señal podría entonces incluir todos los componentes requeridos para producir una señal medible, que puede incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, limpiadores, iones de metal, y una sustancia de unión específica requerida para la unión de las sustancias que generan la señal. Una discusión detallada de sistemas adecuados

que producen la señal pueden encontrarse en Ullman y otros, US5185243, que es incorporada aquí como referencia en su totalidad.

La presente invención proporciona un método que comprende provocar o permitir la unión de un miembro de unión como el proporcionado aquí al CXCL13. Como es notado, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo a continuación de la administración de un miembro de unión, o ácido nucleico que codifica un miembro de unión, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, Western blotting, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y ensayos bioquímicos o basados en células, tal como un AMPc, liberación de calcio o ensayo de quimiotaxia de células B.

La presente invención también proporciona la medición de los niveles de antígeno directamente, empleando un miembro de unión de acuerdo con la invención por ejemplo en un sistema biosensor. Por ejemplo, la presente invención comprende un método de detectar y/o medir la unión al CXCL13, que comprende, (i) exponer dicho miembro de unión al CXCL13 y (ii) detectar la unión de dicho miembro de unión al CXCL13, donde la unión es detectada usando cualquier método o etiqueta detectable descrita aquí. Este, y cualquier otro método de detección de la unión descrito aquí, pueden ser interpretados directamente por la persona que lleva a cabo el método, por ejemplo, observando visualmente una etiqueta detectable. Como alternativa, este método, o cualquier otro método de detección de la unión descrito aquí, puede producir un reporte en forma de un autoradiógrafo, una fotografía, una impresión por computadora, un reporte de citometría de flujo, un gráfico, una carta, un tubo de ensayo o contenedor o pocillo conteniendo el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

La cantidad de unión del miembro de unión al CXCL13 puede ser determinada. La cuantificación puede ser relacionada con la

cantidad del antígeno en una muestra de prueba, la cual puede ser de interés diagnóstico. La selección para la unión al CXCL13 y/o la cuantificación del mismo pueden ser útiles, por ejemplo, en la selección de pacientes para enfermedades o trastornos referidos aquí y/o cualquier otra enfermedad o trastorno que involucre la actividad y/o expresión de CXCL13 aberrante.

Un número de enfermedades están asociadas con niveles aumentados de CXCL13. Los niveles de CXCL13 son un diagnóstico útil y/o indicador de pronóstico para varios trastornos, por ejemplo, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes, como es descrito aquí en otro lugar. Por ejemplo, los niveles elevados de CXCL13 en por ejemplo las muestras de fluido sinovial y suero, pueden ser usados como un indicador de la artritis reumatoide.

Un método diagnóstico de la invención puede comprender (i) obtener una muestra de tejido o fluido de un sujeto, (ii) exponer dicha muestra de tejido o fluido a uno o más miembros de unión de la presente invención; y (iii) detectar el enlace CXCL13 como es comparado con una muestra control, donde un aumento en la cantidad de la unión de CXCL13 comparado con el control puede indicar un nivel aberrante de la expresión o actividad de CXCL13. Las muestras de tejido o fluido a ser probadas incluyen sangre, suero, orina, material de biopsia, tumores, o cualquier tejido sospechoso de contener niveles de CXCL13 aberrantes. Los sujetos que prueban positivo para actividad o niveles de CXCL13 aberrantes pueden también beneficiarse de los métodos de tratamiento divulgados luego aquí.

Aquellos expertos en el arte son capaces de seleccionar un modo adecuado de determinar la unión del miembro de unión a un antígeno de acuerdo con su preferencia y conocimiento general, a la luz de los métodos divulgados aquí.

Las reactividades de los miembros de unión en una muestra pueden ser determinadas por cualquier medio apropiado. El

radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radioactivo es mezclado con un antígeno no marcado (la muestra de prueba) y se dejó unir al miembro de unión. El antígeno unido es físicamente separado del antígeno no unido y la cantidad de antígeno radioactivo unido al miembro de unión determinado. Mientras más antígeno hay en la muestra de prueba menos antígeno radioactivo se unirá al miembro de unión. Un ensayo de unión competitivo también puede ser usado con un antígeno no radioactivo, usando antígeno o un análogo enlazado a la molécula reportera. La molécula reportera puede ser un colorante de fluorocromo, fósforo o láser con características de absorción o emisión espectralmente aislado. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red, y lantánidos quelatos o criptatos. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado, tal como perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológicamente o químicamente activos que pueden provocar directamente o indirectamente señales detectables a ser visualmente observadas, electrónicamente detectadas o de otro modo registradas. Estas moléculas pueden ser enzimas, que catalizan las reacciones que desarrollan, o cambio de colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Estas pueden ser molecularmente excitables, de manera que las transiciones electrónicas entre estados de energía resulten en absorciones o emisiones espectrales características. Estas pueden incluir entidades química usadas en conjunto con biosensores. Los sistemas de detección biotina/avidina o biotina/eEstreptavidinaa y fosfatasa alcalina pueden ser empleados.

Las señales generadas por los conjugados miembro de unión individual-reportero pueden ser usadas para derivar datos cuantificables absolutos o relativos de la unión del miembro de unión relevante en las muestras (normal y prueba).

Un kit que comprende un miembro de unión de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la presente invención es también proporcionado como un aspecto de la presente invención. En el kit, el miembro de unión puede ser marcado para permitir su reactividad en una muestra a ser determinada, por ejemplo como es descrito adicionalmente a continuación. Además el miembro de unión puede o no estar unido a un soporte sólido. Los componentes de un kit son generalmente estériles y en frascos sellados u otros contenedores. Los kits pueden ser empleados en análisis diagnóstico u otros métodos para los cuales los miembros de unión son útiles. Un kit puede contener instrucciones de uso de los componentes en un método, por ejemplo un método de acuerdo con la presente invención. Los materiales auxiliares para ayudar en o para permitir la realización de un método de este tipo pueden ser incluidos dentro de un kit de la invención. Los materiales auxiliares incluyen un segundo miembro de unión diferente que se une al primer miembro de unión y es conjugado a una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente, isótopo radioactivo o enzima). Los kits basados en anticuerpos también pueden comprender perlas para conducir una inmunoprecipitación. Cada componente de los kits está generalmente en su propio contenedor adecuado. Así, estos kits generalmente comprenden distintos contenedores adecuados para cada miembro de unión. Además, los kits pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y los métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de la ejecución del ensayo.

La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión como anteriormente para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competencia, es decir un método de medir el nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión como el proporcionado por la presente invención en un ensayo de competencia. Esto puede ser cuando la separación física del enlace del antígeno no enlazado no es requerida. El enlace de una molécula reportera al miembro de unión de manera que un cambio físico u óptico tenga lugar en la unión es una posibilidad. La

molécula reportera puede directamente o indirectamente generar señales detectables, que pueden ser cuantificables. El enlace de las moléculas reporteras puede ser directamente o indirectamente, covalentemente, por ejemplo a través de un enlace peptídico, o no covalentemente. El enlace a través de un enlace peptídico puede ser un resultado de la expresión recombinante de una fusión del gen que codifica el anticuerpo y la molécula reportera.

En varios aspectos y realizaciones, la presente invención se extiende a un miembro de unión que compite para la unión al CXCL13, por ejemplo CXCL13 humano, con cualquier miembro de unión definido aquí, por ejemplo anticuerpo 1, por ejemplo en formato IgG1. La competencia entre miembros de unión puede ser ensayada fácilmente *in vitro*, por ejemplo marcando una molécula reportera específica a un miembro de unión que puede ser detectado en presencia de otro(s) miembro(s) de unión no marcado(s), para permitir la identificación de los miembros de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo de solapamiento. La competencia puede ser determinada por ejemplo usando ELISA en el cual el CXCL13 es inmovilizado en una placa y un primer miembro de unión etiquetado o marcado junto con uno o más miembros de unión no etiquetado o no marcado es adicionado a la placa. La presencia de un miembro de unión no etiquetado que compite con el miembro de unión etiquetado es observada por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión etiquetado. En un ejemplo, un ensayo de competencia HTRF® del epítipo puede ser usado.

Por ejemplo, la presente invención incluye un método de identificar un compuesto de unión al CXCL13, que comprende (i) inmovilizar el CXCL13 en un soporte, (ii) contactar dicho CXCL13 inmovilizado simultáneamente o en forma de pasos con al menos un miembro de unión etiquetado o marcado de acuerdo con la invención y uno o más compuestos de unión de prueba no etiquetados o no marcados, y (iii) identificar un nuevo compuesto de unión CXCL13 observando una disminución en la cantidad de etiqueta unida del miembro de unión etiquetado. Tales métodos pueden ser realizados

de una manera con alto rendimiento usando un formato en serie o multipozos. Tales ensayos pueden ser también ser realizados en solución. Ver, por ejemplo, U.S. 5,814,468, que es incorporada aquí como referencia en su totalidad. Como es descrito anteriormente, la detección de la unión puede ser interpretada directamente por la person que lleva a cabo el método, por ejemplo, por observación visual de una etiqueta detectable, o una disminución de la presencia de la misma. Como alternativa, los métodos de unión de la invención pueden producir un reporte en forma de un autoradiógrafo, una fotografía, una impresión de computadora, un reporte de citometría de flujo, un gráfico, una carta, un tubo de ensayo o contenedor o pocillo conteniendo el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

Los ensayos de competencia también pueden ser usados en el mapeo del epítipo. En un ejemplo, el mapeo del epítipo puede ser usado para identificar el epítipo unido por un miembro de unión CXCL13 el cual opcionalmente puede tener características de neutralización y/o modulación optimizadas. Un epítipo de este tipo puede ser lineal o conformacional. Un epítipo conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de CXCL13, donde dichos fragmentos son posicionados próximos uno al otro cuando CXCL13 es plegado en su estructura terciaria o cuaternaria para formar un epítipo conformacional que es reconocido por un inhibidor de CXCL13, tal como un miembro de unión CXCL13. En la prueba para la competencia un fragmento de péptido del antígeno puede ser empleado, especialmente un péptido que incluye o consiste esencialmente en un epítipo de interés. Un péptido que tiene la secuencia del epítipo más uno o más aminoácidos en cualquier extremo puede ser usado. Los miembros de unión de acuerdo con la presente invención pueden ser tales que su unión al antígeno es inhibida por un péptido con o incluyendo la secuencia dada.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o RNA. En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1, de la invención como es definido anteriormente.

La presente invención también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

La presente invención también proporciona una célula hospedera recombinante que comprende uno o más constructos como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1, como es proporcionado, forma en sí mismo un aspecto de la presente invención, como un método de producción del producto codificado, dicho método comprende por lo tanto la expresión del ácido nucleico de codificación. La expresión convenientemente puede ser alcanzada cultivando bajo condiciones apropiadas células hospederas recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión un dominio VH o VL, o miembro de unión puede ser aislado y/o purificado usando cualquier técnica adecuada, usada según lo apropiado.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o RNA y pueden ser completamente o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como es establecida aquí abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de RNA con la secuencia especificada en la que U es sustituido por T, a menos que por el contexto se requiera otra cosa.

Un aspecto todavía adicional proporciona un método de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, el método incluyendo provocar la expresión a partir del ácido nucleico de codificación. Un método de este tipo puede comprender cultivar células hospederas bajo condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Los métodos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión que comprenden un dominio VH y/o VL son proporcionados como aspectos adicionales de la presente invención.

Un método de producción puede comprender un paso de aislamiento y/o purificación del producto. Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospederas diferentes son bien conocidos. Las células hospederas adecuadas incluyen sistemas de bacterias, células de mamíferos, células de plantas, hongos filamentosos, levadura y baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas está bien establecida en el arte. Para una revisión, ver por ejemplo Plückthun [62]. Un hospedero de bacteria común es *E. coli*.

La expresión en células eucariotas en cultivo está también disponible para aquellos expertos en el arte como una opción para la producción de un miembro de unión [63, 64, 65]. La línea celular de mamíferos disponible en el arte para la expresión de un polipéptido heterólogo incluye células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster pequeño, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata

YB2/0, células de riñón embrionicas humanas, células de retina embrionicas humanas y muchas otras.

Los vectores adecuados pueden ser seleccionados o contruidos, conteniendo secuencias regulatorias apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos por ejemplo fagémido, o viral por ejemplo 'fago', según sea apropiado [66]. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión del gen, y análisis de proteínas, son descritos en detalles en Ausubel y otros. [67].

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula hospedera que contiene ácido nucleico como es divulgado aquí. Una célula hospedera de este tipo puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Una célula hospedera de este tipo puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula hospedera puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión de la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos pueden ser usados para la terapia génica.

Todavía un aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir el ácido nucleico de la invención en una célula hospedera. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección de fosfato de calcio, DEAE-Dextrana, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas usando retrovirus u otro virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula hospedera, en particular una célula eucariota puede usar un sistema en base a plásmidos o virus. El

sistema plásmido puede ser mantenido episomalmente o puede ser incorporado en la célula hospedera o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser tanto por integración aleatoria o dirigida de una o más copias en el loci simple o múltiple. Para las células de bacterias, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación, electroporación y transfección de cloruro de calcio usando bacteriófago.

La introducción puede ser seguida por provocar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo mediante el cultivo de células hospederas bajo condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado puede ser alcanzada por métodos conocidos por uno de experiencia en el arte.

El ácido nucleico de la invención puede ser integrado en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula hospedera. La integración puede ser promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándares.

La presente invención también proporciona un método que comprende usar a constructo como se declaró anteriormente en un sistema de expresión para expresar un miembro de unión o polipéptido como anteriormente.

Los miembros de unión de la presente invención pueden ser usados en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo humanos. Los miembros de unión para el CXCL13 pueden ser usados para tratar trastornos asociados con el CXCL13, por ejemplo asociados con la actividad y/o expresión de CXCL13 aberrante. Existen evidencias de la intervención de CXCL13 en una variedad de trastornos, como se discutió aquí en otro lugar. Los miembros de unión de la invención pueden ser usados para inhibir la unión de CXCL13 al CXCR5 y por lo tanto tratar una enfermedad o trastorno mediado por la unión de CXCL13 al CXCR5. Los trastornos asociados con el CXCL13 incluyen trastornos

que son provocados y/o exacerbados por la unión de CXCL13 a su receptor CXCR5. Los aspectos de la invención se relacionan con el tratamiento de tales trastornos aliviando o mejorando uno o más síntomas y/o causas del trastorno.

Los miembros de unión para el CXCL13 pueden ser usados para inhibir o reducir la formación y/o desarrollo aberrante de folículos linfoides, por ejemplo folículos linfoides ectópicos, tal como aquellos encontrados en el sinovio artrítico. Los miembros de unión pueden inhibir o reducir: el reclutamiento de células B y/o células dendríticas y/o células T cooperadoras de B foliculares, mediado por la señalización de CXCL13-CXCR5 en los folículos; y/o reduce la producción de inmunoglobulina por las células B foliculares; y/o inhibe o reduce la producción de células B foliculares de citoquinas y/o la activación de células T. Los miembros de unión también pueden ser usados para inhibir o reducir la destrucción aberrante de huesos y/o cartílagos.

Los miembros de unión pueden ser así usados para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con los folículos linfoides aberrantes o ectópicos. Los trastornos asociados con los folículos linfoides ectópicos incluyen la artritis reumatoide, síndrome de Sjogrens, esclerosis múltiple, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedades autoinmunes de las tiroides (por ejemplo enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto), infección crónica por ejemplo Neuroborreliosis de Lyme y rechazo cardíaco agudo que caracterizan el efecto Quilty.

Por ejemplo el sinovio artrítico inflamado generalmente se caracteriza por: folículos linfoides ectópicos conteniendo centros germinales; infiltrado de células inflamatorias; producción de células B de autoanticuerpos y citoquinas; activación de células B de células T; y/o destrucción de huesos y cartílagos. Los miembros de unión pueden afectar la formación de los folículos ectópicos como es descrito aquí y así inhibir la producción de células B de autoanticuerpos y/o

inflamación sinovial. Así, los miembros de unión pueden ser usados en el tratamiento de trastornos artríticos tales como la artritis reumatoide (RA), y/o osteoartritis.

Los miembros de unión de la invención pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades o trastornos de huesos y/o articulaciones, especialmente enfermedades o trastornos asociados con la destrucción y/o remodelación de huesos y/o cartílagos, por ejemplo rotación aberrante de huesos o cartílagos. Por ejemplo, los miembros de unión pueden ser usados para tratar la artritis reumatoide y/o osteoartritis.

Los miembros de unión de la invención pueden ser usados para inhibir la quimiotaxia de linfocitos (por ejemplo células B y/o T), y así pueden ser usados para tratar trastornos asociados con la quimiotaxia de linfocitos tal como la infección viral (por ejemplo infección por VIH) y leucemia (por ejemplo leucemia linfocítica aguda descendiente de células T y leucemia linfocítica aguda y crónica descendiente de células B).

Los miembros de unión de la invención pueden ser usados para inhibir la proliferación de linfomas y así pueden ser usados para tratar trastornos asociados con proliferación de linfomas, tal como la leucemia (por ejemplo leucemia linfocítica aguda descendiente de células T y leucemia linfocítica aguda y crónica descendiente de células B).

Los miembros de unión para CXCL13 pueden ser usados para inhibir la formación y/o desarrollo aberrante de folículos linfoides, por ejemplo folículos linfoides ectópicos, inhibir la destrucción y/o remodelación aberrante de huesos y/o cartílagos, y/o para inhibir la quimiotaxia de linfocitos y/o proliferación de linfomas como es descrito aquí. En correspondencia, la invención proporciona un método de inhibir la formación y/o desarrollo aberrante de folículos linfoides, por ejemplo folículos linfoides ectópicos, inhibir la destrucción y/o remodelación aberrante de huesos y/o

cartílagos, y/o inhibir la quimiotaxia de linfocitos y/o proliferación de linfomas, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de uno o más miembros de unión de la presente invención solos o en un régimen terapéutico combinado con otro medicamento apropiado conocido en el arte o descrito aquí de manera que la formación y/o desarrollo aberrante de folículos linfoides, por ejemplo folículos linfoides ectópicos, la destrucción y/o remodelación aberrante de huesos y/o cartílagos, y/o la quimiotaxia de linfocitos y/o proliferación de linfomas es o son inhibidas.

Los miembros de unión de la invención pueden ser usados en el diagnóstico de enfermedades o trastornos asociados con el CXCL13 por ejemplo en los cuales los niveles de CXCL13 son alterados por ejemplo niveles relevantes a normales elevados. Los miembros de unión pueden ser usados en el diagnóstico de una o más enfermedades o trastornos descritos aquí, incluyendo por ejemplo la artritis reumatoide, Síndrome de Sjogren, VIH, miastenia gravis, linfoma de células T angioinmunoblásticas y encefalopatía espongiiforme transmisible (TSE).

La evidencia de la intervención de CXCL13 en algunos trastornos es descrito a continuación y aquí en otro lugar. Además, el dato presentado aquí indica además que los miembros de unión de la invención pueden ser usados para tratar tales trastornos, incluyendo el tratamiento preventivo y la reducción de la gravedad de los trastornos. En correspondencia, la invención proporciona un método de tratar o reducir la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos mencionados aquí, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad efectiva de uno o más miembros de unión de la presente invención solo o en un régimen terapéutico combinado con otro medicamento apropiado conocido en el arte o descrito aquí de manera que la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos anteriores sea reducido.

La evidencia de la función de CXCL13 en el desarrollo de órganos linfoides periféricos y en la inmunidad innata es descrita en parte aquí en otro lugar.

Además de esto, varias líneas de evidencia indican una función para el CXCL13 en la patogénesis de la artritis reumatoide (RA) en el hombre. Por ejemplo, la expresión de CXCL13 ARNm y la proteína es elevada en el sinovio RA [68], existe una correlación positiva entre los niveles de la proteína de CXCL13 en el sinovio RA y la gravedad de la enfermedad [69]. También hemos descubierto que niveles elevados de CXCL13 han sido medidos en el fluido del suero y sinovial de pacientes con RA, indicando que los miembros de unión de la invención pueden ser usados en métodos de diagnóstico de RA como es descrito aquí.

El sinovio inflamado se caracteriza por un infiltrado de células inflamatorias y la presencia de agregados linfocíticos organizados que semejan el tejido linfoide. Estas estructuras linfoides ectópicas contienen características de centros germinales incluyendo la presencia de FDC, y venas del alto endotelio (HEV). Los centros germinales proporcionan un microambiente que soporta la diferenciación de las células B en las células del plasma y la generación de anticuerpos de alta afinidad tal como el factor reumatoide [70]. La proteína de CXCL13 en el sinovio RA ha sido inmunolocalizada para las FDC dentro de centros germinales [69] y para los macrófagos en los infiltrados celulares [71]. En las lesiones RA, el CXCL13 es fuertemente predictivo de la formación del folículo linfoide ectópico y el desarrollo de reacciones centro germinales (Takemura, S. y otros. J. Immunol. 167: 1072-1080, 2001).

La función de CXCL13 en RA es además soportada por la evidencia *in vivo* de modelos animales de la enfermedad. La dosificación profiláctica de un anticuerpo de neutralización de CXCL13 reduce la gravedad de la enfermedad en la artritis inducida por colágeno (CIA) en el ratón, con una reducción concomitante en la

infiltración de células inflamatorias en la articulación artrítica y una reducción en el grado de erosión del cartilago y hueso [72]. En el modelo CIA, los folículos en el bazo y las articulaciones de ratones tratados con un anticuerpo anti-CXCL13 contienen pocos centros germinales y los centros germinales son más pequeños de tamaño comparados con los ratones control [72].

Otros estudios han demostrado que ratones deficientes en CXCR5 desarrollan síntomas menos graves en un modelo de artritis inducida por el adyuvante (AIA) con una reducción en la inflamación sinovial y destrucción de la articulación (Hartmann, S. y otros, European Congress on Immunology, resumen 2672, 2006). La formación de centros germinales organizados, los niveles de respuestas proliferativas de células T inducidas por antígeno y anticuerpos anti-antígeno también fueron reducidas en este estudio.

Una función de CXCL13 en la rotación de huesos y cartílagos ha sido también demostrada por evidencia *in vitro* a partir de condrocitos y osteoblastos cultivados. El CXCR5 es expresado en condrocitos aislados de cartilago articular de pacientes con osteoartritis (OA). El tratamiento de estos condrocitos en condiciones de cultivo con CXCL13 induce a la liberación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) y la captación de B así como inducir la proliferación [73]. El CXCL13 también induce la proliferación de los osteoblastos cultivados derivados de los pacientes con OA y la expresión del ARNm para la interleucina-1 (IL-1) [74]. La secreción basal de CXCL13 a partir de los osteoblastos cultivados también puede ser potenciada por el tratamiento con IL-1 [75]. En muestras de hueso tomadas de pacientes con RA que experimentan cirugía de la articulación, la proteína de CXCL13 es inmunolocalizada para los agregados celulares mononucleares en la médula ósea conteniendo características de neogénesis linfóide [76].

El receptor CXCR5 es expresado en un subconjunto de células T de memoria con función cooperadora de células B, las que son designadas células T cooperadoras B foliculares (T_{FH}). El CXCL13 induce la quimiotaxia de las células T_{FH} que expresan el CXCR5 aislado de la amígdala humana [77], mientras que en órganos linfoides secundarios, las células T_{FH} positivas al CXCR5 localizan a los folículos de células B y centros germinales cuando estos soportan la producción de inmunoglobulina [78]. Las células T_{FH} aisladas recientemente de los centros germinales secretan bajos niveles de CXCL13 pero esto es significativamente elevado después de la estimulación a través de TCR y CD28 (Kim, CH. y otros. Blood, 104: 1952-1960, 2004).

Ha sido identificado un subconjunto de células dendríticas que expresan el CXCR5 y que localizan los folículos linfoides en respuesta al CXCL13 [79]. Esta respuesta es dependiente de la linfoxina unida a la membrana derivada de las células B la cual estimula la expresión de CXCL13 por células estromales foliculares y establece el gradiente quimotáctico necesario para reclutar las células positivas al CXCR5 en los folículos.

Aunque la inhibición del tráfico de células B no tiene precedentes en la clínica, existe un precedente clínico para la eficacia de la terapia de depleción de células B en pacientes con RA [80]. La depleción de células B con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico es efectiva y bien tolerada con pacientes que experimentan períodos sostenidos de remisión de la enfermedad que oscila desde meses a años después de un curso simple de tratamiento. La reducción de los niveles de autoanticuerpos es un mecanismo clave del éxito de la depleción de células B ya que la recaída clínica se correlaciona con el retorno de los autoanticuerpos del suero a los niveles de pre-tratamiento [81]. Además para la producción de autoanticuerpos, se piensa que las células B contribuyen a la progresión de la RA a través de la producción de citoquina y activación de células T a través de la presentación del antígeno.

La inhibición del tráfico de células B mediante la neutralización de CXCL13 representa una novedosa aproximación para el tratamiento de la RA. La neutralización de CXCL13 tiene el potencial tanto para inhibir la producción de autoanticuerpos y la inflamación sinovial a través de la interrupción de las reacciones centro germinales y los folículos ectópicos en el sinovio de RA. La neutralización de CXCL13 también puede proporcionar beneficios adicionales previniendo la destrucción de huesos y cartílagos mediante mecanismos directos e indirectos.

Elevados niveles de CXCL13 han sido descritos en VIH (Widney, DP. y otros. J. Int. Cyt. Res. 25: 702-706, 2005). El uso de CXCL13 como marcador sustituto para la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) también ha sido reportado (EP1703282A1).

Un miembro de unión de la invención puede ser usado en el tratamiento de cualquiera de lo siguiente:

1. tracto respiratorio: enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen: el asma, incluyendo asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por el ejercicio, por fármacos (incluyendo la aspirina y la inducida por AINES) y asma inducida por polvo, tanto intermitente y persistente y de todas las severidades, y otras causas de hiper-respuesta de las vías respiratorias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis, incluyendo bronquitis infecciosa y bronquitis eosinofílica; enfisema, bronquiectasias, fibrosis quística, sarcoidosis; enfermedad del pulmón del agricultor y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar, incluyendo alveolitis criptogénica fibrosante, neumonías intersticial idiopática, fibrosis que complican la terapia anti-neoplásica y la infección crónica, incluyendo la tuberculosis y la aspergilosis y otras infecciones por hongos; las complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos trombóticos y vasculíticos de la vasculatura pulmonar, hipertensión pulmonar y; actividad antitusígena incluyendo el

tratamiento de la tos crónica asociada con condiciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias, tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica incluyendo rinitis medicamentosa, y rinitis vasomotora; rinitis alérgica estacional y perenne incluyendo la rinitis nerviosa (fiebre del heno), poliposis nasal, infección viral aguda incluido el resfrío común, y la infección debida al virus sincicial respiratorio, influenza, coronavirus (incluyendo SARS) y adenovirus;

2. huesos y articulaciones: artritis asociada con o que incluye la osteoartritis/osteoartrosis, tanto primarias como secundarias, por ejemplo, displasia congénita de cadera; cervical y lumbar, espondilitis, y dolor de la espalda baja y de cuello, artritis reumatoide y la enfermedad de Still; espondiloartropatías seronegativas incluidas la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, la artritis reactiva y la espondartropatía indiferenciada; artritis séptica y otras infecciones relacionadas con las artropatías y trastornos óseos, como la tuberculosis, incluyendo la enfermedad de Potes y el síndrome de Poncet; sinovitis inducida por cristal (artritis gotosa) incluida la gota úrica, enfermedad por deposición de pirofosfato de calcio, inflamación sinovial y bursal del tendón relacionada con apatita de calcio e; enfermedad de Behcet; síndrome de Sjogren primario y secundario, la esclerosis sistémica y la esclerodermia limitada; lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, y enfermedad indiferenciada del tejido conectivo miopatías inflamatorias incluyendo dermatomiositis y polimiositis; polimalgia reumática, artritis juvenil incluyendo artritis inflamatoria idiopática de cualquier distribución articular y síndromes asociados, y la fiebre reumática y sus complicaciones sistémicas; vasculitis incluidas arteritis de células gigantes, arteritis de Takayasu, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, poliarteritis microscópica, y vasculitis asociada con infección viral, reacciones de hipersensibilidad, crioglobulinas, y paraproteínas; dolor lumbar, fiebre Mediterránea Familiar, síndrome de Muckle-

Wells, y Fiebre Hibernian Familiar, enfermedad de Kikuchi; artalgias, tendinitis, y miopatías inducidas por fármacos.

3. dolor y la remodelación del tejido conectivo de los trastornos músculo esqueléticos originados por lesión [por ejemplo, lesiones deportivas] o enfermedad: artritis (por ejemplo la artritis reumatoide, osteoartritis, la gota de cristal o artropatía), otro conjunto de enfermedades (como la degeneración del disco intervertebral o degeneración de la articulación temporomandibular), enfermedad de remodelación ósea (como la osteoporosis, enfermedad de Paget o osteonecrosis), policondritits, esclerodermia, desorden mixto del tejido conectivo, espondiloartropatias o enfermedad periódontal (como periodontitis);

4. piel: psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto u otras dermatosis eczematosas, y reacciones tardías de hipersensibilidad de tipo fito y fotodermatitis; dermatitis seborreica, dermatitis herpetiforme, liquen plano, liquen escleroso y atrófico, pioderma gangrenosa, sarcoidosis de la piel, lupus eritematoso discoide, pénfigo, penfigoide, epidermolisis bulosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritemas tóxicos, eosinofilia cutánea, alopecia areata, patrón de calvicie masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulitis, tanto infecciosas y no infecciosas; paniculitis; los linfomas cutáneos, cáncer cutáneo no melanoma y otras lesiones displásicas; trastornos inducidos por fármacos incluyendo exantema fijo medicamentoso;

5. ojos: blefaritis, conjuntivitis, incluyendo conjuntivitis vernal y alérgica perenne; iritis; uveitis anterior y posterior; coroiditis; autoinmune; trastornos degenerativos o inflamatorios que afectan a la retina; oftalmatitis incluyendo oftalmatitis simpático; sarcoidosis, incluyendo infecciones virales, micóticas y bacterianas;

6. tracto gastrointestinal: glositis, gingivitis, periodontitis, esofagitis, incluyendo reflujo; gastro-enteritis eosinofílica, mastocitosis, la enfermedad de Crohn, colitis incluyendo la colitis ulcerosa, proctitis, prurito anal;

- enfermedad celiaca, síndrome del colon irritable y alergias relacionadas con los alimentos que pueden tener efectos fuera del intestino (por ejemplo, la migraña, rinitis o eczema);
7. abdominal: hepatitis, incluyendo autoinmune, alcohólica y viral; fibrosis y cirrosis del hígado; colecistitis, pancreatitis, tanto aguda como crónica;
8. genitourinario: incluyendo nefritis intersticial y glomerulonefritis, síndrome nefrótico, incluyendo cistitis aguda y crónica (intersticial) cistitis y la úlcera de Hunner; agudas y crónicas, uretritis, prostatitis, epididimitis, salpingitis y ooforitis; vulvovaginitis, la enfermedad de Peyronie, la disfunción eréctil (tanto en hombres como en mujeres);
9. rechazo al aloinjerto: agudo y crónico, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, médula ósea, la piel o la córnea o después de transfusión de sangre; o enfermedad crónica del injerto contra el huésped;
10. CNS: la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos demenciales incluida la CJD y nvCJD; amiloidosis; esclerosis múltiple y otros síndromes desmielinizantes; aterosclerosis cerebral y vasculitis, arteritis temporal; miastenia gravis; dolor agudo y crónico (agudo, intermitente o persistente, ya sea de origen central o periférico), incluyendo el dolor visceral, dolor de cabeza, migraña, neuralgia del trigémino, dolor facial atípico, articulaciones y dolor de huesos, dolor derivado de cáncer y tumores, los síndromes de dolor neuropático diabético entre ellos, post-herpético, y neuropatías asociadas a VIH; neurosarcooidosis; complicaciones malignas del sistema nervioso central y periférico, procesos infecciosos o autoinmunes;
11. otros trastornos autoinmunes y alérgicos: incluyendo la tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves-Basedow, enfermedad de Addison, la diabetes mellitus, trombocitopenia púrpura idiopática, fascitis eosinofílica, síndrome hiper-IgE, síndrome antifosfolipídico;
12. otros trastornos con una respuesta inflamatoria o componente inmunológico; incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la lepra, el síndrome de Sezary, y los

síndromes paraneoplásicos;

13. cardiovascular: arteriosclerosis, que afecta a las arterias coronarias y la circulación periférica, pericarditis, miocarditis, inflamatorias y miocardiopatías autoinmune incluyendo sarcoidosis miocárdica; lesiones por isquemia-reperusión; endocarditis, valvulitis, y entre ellos aortitis infecciosa (por ejemplo sifilítica); vasculitis; trastornos de las venas proximal y periféricas incluidas flebitis y trombosis, entre ellos trombosis venosa profunda y las complicaciones de varices;

14. oncología: tratamiento de cánceres entre ellos de próstata, mama, pulmón, ovario, páncreas, intestino y colon, estómago, la piel y tumores cerebrales y tumores malignos que afectan a la médula ósea (incluidas leucemias) y sistemas linfoproliferativos, como linfoma de Hodgkin y no - Linfoma de Hodgkin, incluyendo la prevención y el tratamiento de la enfermedad metastásica y recidivas tumorales, y los síndromes paraneoplásicos y,

15. tracto gastrointestinal: La enfermedad celíaca, proctitis, gastro-enteritis eosinofílica, mastocitosis, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis indeterminada, trastorno de intestino irritable, síndrome de colon irritable, diarrea no inflamatoria, alergias relacionadas con los alimentos que tienen efectos fuera desde el intestino, por ejemplo, la migraña, rinitis y eczema.

Los miembros de unión de la invención pueden ser usados en animales o en modelos animales de enfermedad, incluyendo ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, monos, peces, perros, vacas, cabras, caballos, etc. Los modelos animales que involucran el sistema de señalización CXCL13/CXCR5 son conocidos en el arte. Por ejemplo, los modelos animales de artritis reumatoide son conocidos, por ejemplo los modelos CIA, AIA y de la pared celular de estreptococos (SCW). Un modelo animal de MS es el modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Los modelos de ratón de SLE incluyen el modelo de ratón MRL/lpr y el modelo de ratón NZB x NZW F₁ (BWF₁).

Así, los miembros de unión de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades o trastornos que involucran el CXCL13, por ejemplo la expresión y/o actividad de CXCL13, especialmente la expresión/actividad aberrante. Un método de tratamiento puede comprender administrar una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención a un paciente en necesidad del mismo, donde la expresión y/o actividad aberrante de CXCL13 es disminuida. Un método de tratamiento puede comprender (i) identificar un paciente que demuestra niveles o actividad aberrante de CXCL13, por ejemplo usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente, y (ii) administrar una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención al paciente, donde la expresión y/o actividad aberrante de CXCL13 es disminuida. Una cantidad efectiva de acuerdo con la invención es una cantidad que disminuye la expresión y/o actividad aberrante de CXCL13 de manera de disminuir o aliviar la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno particular que está siendo tratado, pero no necesariamente curar la enfermedad o trastorno.

La invención también proporciona un método de antagonizar al menos un efecto de CXCL13 que comprende contactar con o administrar una cantidad efectiva de uno o más miembros de unión de la presente invención de manera que dicho al menos un efecto de CXCL13 sea antagonizado. Los efectos de CXCL13 que pueden ser antagonizados por los métodos de la invención incluyen la unión al CXCR5, y cualquier efecto aguas abajo que surja como consecuencia de estas reacciones de unión. Así, los miembros de unión de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades o trastornos que involucran la señalización de CXCL13-CXCR5, especialmente la señalización de CXCL13-CXCR5 aberrante.

En correspondencia, los aspectos adicionales de la invención proporcionan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión como el proporcionado, las

composiciones farmacéuticas que comprenden un miembro de unión de este tipo, y el uso de un miembro de unión de este tipo en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo en un método de hacer un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del(de los) compuesto(s) activo(s), un aumento en su vida útil y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento en su solubilidad en solución o también una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por la persona experimentada en el arte como una función de la naturaleza y del modo de administración del(de los) compuesto(s) activo(s) seleccionados.

Los miembros de unión de la presente invención usualmente serán administrados en forma de una composición farmacéutica, la que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión. Así, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para usar de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un portador, buffer, estabilizador, excipiente farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en el arte. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. Esta naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, inhalado, intratraqueal, tópica, intravesicular o por inyección, como es discutido a continuación.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral, tal como por ejemplo moléculas de anticuerpos de dominio simple (por

ejemplo "nanocuerposTM") etc. son también considerados en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semi-sólida. Una tableta puede comprender un portador sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones líquidas farmacéuticas generalmente comprenden un portador líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. La solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tal como etileno glicol, propileno glicol o polietileno glicol pueden ser incluidos.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos de experiencia relevante en el arte son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tal como Inyección Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. Los preservantes, estabilizadores, buffers, antioxidantes y/o otro aditivos pueden ser empleados según se requiera incluyendo buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; preservantes (tales como octadecildimetilbencil amonio cloruro; hexametonio cloruro; benzalconio cloruro; bencetonio cloruro; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albumina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelatantes, tal como EDTA; azúcares, tales como sucrosa, manitol, trealosa o sorbitol; contra iones que forman sal, tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo

complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tal como TWEENTM, PLURONICSTM o polietileno glicol (PEG).

Los miembros de unión de la presente invención pueden ser formulados en formas líquida, semi-sólida o sólida dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la ruta de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y surfactantes. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio rango de concentraciones de anticuerpos y pH. Las formulaciones sólidas pueden ser producidas por liofilización, secado por aspersion, o secado por tecnología de fluido supercrítico, por ejemplo. Las formulaciones de anti-CXCL13 dependerán de la ruta pretendida de administración por ejemplo, las formulaciones para administración pulmonar pueden consistir en partículas con propiedades físicas que aseguran la penetración en lo profundo del pulmón tras la inhalación; las formulaciones tópicas (por ejemplo para el tratamiento de la cicatrización, por ejemplo cicatrización dérmica) pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco es residente en el sitio de acción. Un miembro de unión puede ser preparado con un portador que protegerá el miembro de unión contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Los polímeros biocompatibles, biodegradables, pueden ser usados, tales como etileno vinil acetato, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por aquellos expertos en el arte [82].

El tratamiento anti-CXCL13 puede ser dado oralmente (tal como por ejemplo moléculas de anticuerpos de dominio simple (por ejemplo "nanocuerposTM")) por inyección (por ejemplo, subcutáneamente, intraarticular, intravenosamente, intraperitoneal, intraarterial o intramuscular), por inhalación, intratraqueal, por la ruta

intravesicular (instilación en la vejiga urinaria), o tópicamente (por ejemplo intraocular, intranasal, rectal, en heridas, en la piel). El tratamiento puede ser administrado por infusión de pulso particularmente con dosis decedentes del miembro de unión. La ruta de administración puede ser determinada por las características físicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por el requerimiento de optimizar la eficacia o minimizar los efectos secundarios. Una ruta de administración particular es la intravenosa. Otra ruta de administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención es subcutáneamente. Es considerado que el tratamiento anti-CXCL13 no será restringido al uso en la clínica. Por lo tanto, la inyección subcutánea usando un dispositivo libre de agujas es también ventajosa.

Una composición puede ser administrada sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la afección a ser tratada.

Un miembro de unión para el CXCL13 puede ser usado como parte de una terapia de combinación en conjunto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación pueden ser usados para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro de unión anti-CXCL13 con uno o más de otro fármacos. Un miembro de unión para el CXCL13 puede ser administrado concurrentemente o secuencialmente o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de uno o más de las afecciones relacionadas aquí.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede ser proporcionado en combinación o adición con uno o más de los siguientes agentes:

- una citoquina o agonista o antagonista de la función de la citoquina (por ejemplo un agente que actúa en los pasos de señalización de la citoquina, tal como un modulador del sistema

SOCS), tal como un interferó alfa-, beta- y/o gamma; factor de crecimiento tipo insulina tipo I (IGF-1), sus receptores y proteínas de unión asociadas; interleucinas (IL), por ejemplo una o más de IL-1 a -33, y/o un antagonista o inhibidor de la interleucina, tal como anakinra; inhibidores de los receptores de los miembros de la familia de la interleucina o inhibidores de subunidades específicas de tales receptores, un inhibidor alfa factor de necrosis tumoral (TNF- α), tal como un anticuerpo monoclonal anti-TNF (por ejemplo infliximab, adalimumab y/o CDP-870) y/o un antagonista del receptor del TNF, por ejemplo una molécula de inmunoglobulina (tal como etanercept) y/o un agente de bajo peso molecular, tal como pentoxifilina;

- un modulador de células B, por ejemplo un anticuerpo monoclonal dirigido a los linfocitos B (tal como CD20 (rituximab, MRA-aIL16R o Belimumab) o linfocitos T (por ejemplo CTLA4-Ig (Abatacept), HuMax Il-15);
- un modulador de la activación, maduración o supervivencia de células B (tal como Atacicept);
- un modulador de la función inmune, por ejemplo un antagonista de los pasos de la linfoxina LIGHT (tal como LTBR-Fc)
- un modulador que inhibe la actividad del osteoclasto, por ejemplo un anticuerpo para RANKL;
- un modulador de la quimioquina o de la función receptora de la quimioquina, tal como un antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11 (para la familia C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y CXCR5 y CXCR6 (para la familia C-X-C) y CX₃CR1 para la familia C-X₃-C;
- un inhibidor de la metaloproteasa de la matriz (MMP), es decir una o más de las estromelisin, las collagenasas y las gelatinasas así como agrecanasa, especialmente collagenasa-1 (MMP-1), collagenasa-2 (MMP-8), collagenasa-3 (MMP-13), estromelisin-1 (MMP-3), estromelisin-2 (MMP-10) y/o estromelisin-3 (MMP-11) y/o MMP-9 y/o MMP-12, por ejemplo un agente tal como doxiciclina;
- un inhibidor de la biosíntesis del leucotrieno, inhibidor de la 5-lipoxigenasa (5-LO) o antagonista de la proteína de activación de la 5-lipoxigenasa (FLAP), tal como zileutón; ABT-

761; fenleutón; tepoxalin; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-sustituido)-tiofeno-2-alquilsulfonamidas; 2,6-di-tert-butilfenolhidrazonas; metoxitetrahidropiranos tal como Zeneca ZD-2138; el compuesto SB-210661; un compuesto de 2-cianonaftaleno piridinil-sustituido, tal como L-739,010; un compuesto de 2-cianoquinolina, tal como L-746,530; indol y/o un compuesto de quinolina, tales como MK-591, MK-886 y/o BAY x 1005;

- un antagonista del receptor de leucotrienos (LT) B4, LTC4, LTD4, y LTE4, seleccionado del grupo que consiste en fenotiazin-3-1s, tal como L-651,392; compuestos amidino, tal como CGS-25019c; benzoxalaminas, tal como ontazolast; bencenocarboximidamidas, tal como BIIL 284/260; y compuestos, tales como zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) y BAY x 7195;
- un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE), tal como una metilxantanina, por ejemplo teofilina y/o aminofilina; y/o un inhibidor selectivo de la isoenzima PDE, por ejemplo un inhibidor de PDE4 y/o inhibidor de la isoforma PDE4D y/o un inhibidor de PDE5;
- un antagonista del receptor de la histamina tipo 1, tales como cetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclicina, y/o mizolastina (generalmente aplicada oralmente, tópicamente o parenteralmente);
- un inhibidor de la bomba de protones (tal como omeprazol) o antagonista del receptor gastroprotector de la histamina tipo 2;
- un antagonista del receptor de la histamina tipo 4;
- un agente simpatomimético vasoconstrictor agonista del adrenoceptor alfa-1/alfa-2, tal como propilhexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, nafazolina hidrocloreuro, oximetazolina hidrocloreuro, tetrahidrozolina hidrocloreuro, xilometazolina hidrocloreuro, tramazolina hidrocloreuro y etilnorepinefrina hidrocloreuro;
- un agente anticolinérgico, por ejemplo un antagonista del receptor muscarínico (M1, M2, y M3), tales como atropina,

hioscina, glicopirrrrolato, bromuro de ipratropio, bromuro de tiotropio, bromuro de oxitropio, pirenzepina y telenzepina;

- un agonista del adrenoceptor beta (incluyendo los subtipos del receptor beta 1-4), tales como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, bitolterol mesilato y/o pirbuterol, por ejemplo un enantiómero quiral del mismo;
- una cromona, por ejemplo cromoglicato de sodio y/o nedocromil sodio;
- un glucocorticoide, tales como flunisolida, triamcinolona acetona, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato de fluticasona, ciclesonida, y/o furoato de mometasona;
- un agente que modula los receptores de la hormona nuclear, tal como a PPAR;
- una inmunoglobulina (Ig) o preparación Ig o un antagonista o anticuerpo que modula la función Ig, tal como anti-IgE (por ejemplo omalizumab);
- otro agente antiinflamatorio sistémico o tópicamente aplicado, por ejemplo talidomide o un derivado del mismo, un retinoide, ditranol y/o calcipotriol;
- las combinaciones de aminosalicilatos y sulfapiridina, tales como sulfasalazina, mesalazina, balsalazida, y olsalazina; y agentes inmunomoduladores, tales como las tiopurinas; y corticosteroides, tal como budesonida;
- un agente antibacteriano, por ejemplo un derivado de la penicilina, una tetraciclina, un macrólido, una beta-lactamá, una fluoroquinolona, metronidazol y/o un aminoglicósido inhalado; y/o un agente antiviral, por ejemplo aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirin; zanamavir y/o oseltamavir; un inhibidor de proteasa, tales como indinavir, nelfinavir, ritonavir y/o saquinavir; un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido, tales como didanosina, lamivudina, stavudina, zalcitabina, zidovudina; un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido, tales como nevirapina, efavirenz;

- una agente cardiovascular, tal como un bloqueador del canal de calcio, bloqueador del adrenoceptor beta, inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina (ACE), antagonista del receptor de la angiotensina-2; agente de reducción de lípidos, tal como una estatina y/o fibrato; un modulador de la morfología celular de la sangre, tal como pentoxifilina; un trombolítico y/o un anticoagulante, por ejemplo un inhibidor de la agregación plaquetaria;
- un agente del CNS, tal como un antidepresivo (tal como sertralina), fármaco anti-Parkinsoniano (tal como deprenil, L-dopa, ropinirol, pramipexol; inhibidor de MAOB, tales como selegina y rasagilina; inhibidor comp, tal como tasmar; inhibidor A-2, inhibidor de la reabsorción de la dopamina, antagonista de NMDA, agonista de la nicotina, agonista de la dopamina y/o inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal) y un fármaco contra el Alzheimer, tales como donepezil, rivastigmina, tacrina, inhibidor de COX-2, propentofilina o metrifonato;
- un agente para el tratamiento del dolor agudo y crónico, por ejemplo un analgésico que actúa centralmente o periféricamente, tal como un análogo o derivado opioide, carbamazepina, fenitoina, valproato de sodio, amitriptilina u otro agente antidepresivo, paracetamol, o agente antiinflamatorio no esteroide;
- un agente anestésico local aplicado parenteralmente o tópicamente (incluyendo inhalado), tal como lignocaina o un analogo del mismo;
- un agente anti-osteoporosis, por ejemplo un agente hormonal, tal como raloxifeno, o un bifosfonato, tal como alendronato;
- (i) un inhibidor de triptasa; (ii) un antagonista del factor de activación plaquetaria (PAF); (iii) un inhibidor de la enzima de conversión de la interleucina (ICE); (iv) un inhibidor de IMPDH; (v) un inhibidor de la molécula de adhesión incluyendo un antagonista VLA-4; (vi) una captosina; (vii) un inhibidor de quinasa, por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa (tales como Btk, Itk, los ejemplos de inhibidores Jak3 MAP pudieran incluir Gefitinib, Imatinib mesilato), una serina/treonina quinasa (por ejemplo un inhibidor de MAP quinasa, tales como p38, JNK,

proteína quinasas A, B y C y IKK), o una quinasa involucrada en la regulación del ciclo celular (por ejemplo una quinasa dependiente de cilina); (viii) un inhibidor de glucosa-6 fosfato dehidrogenasa; (ix) antagonista del receptor de kinina-B.sub1. o B.sub2.; (x) agente anti-gota, por ejemplo colchicina; (xi) inhibidor de la xantina oxidasa, por ejemplo alopurinol; (xii) agente uricosúrico, por ejemplo probenecid, sulfinpirazona o benzbromarona; (xiii) secretagogo de la hormona de crecimiento; (xiv) factor de crecimiento transformante (TGF β); (xv) factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); (xvi) factor de crecimiento fibroblástico por ejemplo factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); (xvii) factor de estimulación de la colonia de macrófago granulocito (GM-CSF); (xviii) crema capsaicina; (xix) antagonista del receptor de la taquiquinina NK.sub1. o NK.sub3. tales como NKP-608C, SB-233412 (talnetant) o D-4418; (xx) inhibidor de la elastasa tales como UT-77 o ZD-0892; (xxi) inhibidor de la enzima de conversión TNF-alfa (TACE); (xxii) inhibidor de la sintasa óxido nítrico inducida (iNOS); (xxiii) molécula homóloga al receptor quimioatrayente expresada en células TH2, (tal como un antagonista CRTH2); (xxiv) inhibidor de P38; (xxv) agente modulador de la función de los receptores similares a Toll (TLR), (xxvi) agente modulador de la actividad de los receptores purinérgicos tal como P2X7; o (xxvii) inhibidor de la activación del factor de transcripción tales como NF κ B, API, o STATS.

Un inhibidor puede ser específico o puede ser un inhibidor mezclado, por ejemplo un inhibidor dirigido a más de una molécula (por ejemplo receptores) o clases moleculares mencionadas anteriormente.

El miembro de unión también pudiera ser usado en asociación con un agente quimioterapéutico u otro inhibidor de la tirosina quinasa en co-administración o en forma de un inmunoconjugado. Los fragmentos de dicho anticuerpo también pudieran ser usados en los anticuerpos biespecíficos obtenidos por mecanismos recombinantes o acoplamiento bioquímico y luego asociando la

especificidad del anticuerpo descrito anteriormente con la especificidad de otro anticuerpo capaz de reconocer otras moléculas involucradas en la actividad para la cual el CXCL13 está asociado.

Para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, por ejemplo artritis reumatoide, osteoartritis, asma, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), o psoriasis, un miembro de unión de la invención puede ser combinado con uno o más agentes, tal como agentes antiinflamatorios no esteroides (en lo adelante NSAID) incluyendo inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-1 / COX-2 tanto si se aplica tópicamente o sistémicamente, tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propionicos, tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno e ibuprofeno, fenamatos, tales como ácido mefenamico, indometacina, sulindac, azapropazona, pirazolonas, tal como fenilbutazona, salicilatos, tal como aspirina); inhibidores selectivos de COX-2 (tales como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib y etoricoxib); donantes óxido nítricos que inhiben la ciclooxigenasa (CINOD); glucocorticosteroides (tanto si se administran por ruta tópica, oral, intramuscular, intravenosa o intraarticular); metotrexato, leflunomida; hidroxiclороquina, d-penicilamina, auranofin u otras preparaciones parenterales o de oro orales; analgésicos; diacereína; terapias intraarticular, tal como derivados del ácido hialurónico; y suplementos nutricionales, tal como glucosamina.

Un miembro de unión de la invención también puede ser usado en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de cáncer. Los agentes adecuados a ser usados en combinación incluyen:

(i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, tal como se utiliza en oncología médica, tal como Gleevec (imatinib mesilato), agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalán, clorambucil, busulfán y nitrosoureas); antimetabolitos

(por ejemplo antifolatos tal como fluoropirimidinas como el 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinosida, hidroxiaurea, gemcitabina y paclitaxel); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicin, mitomicina C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo alcaloides vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere); e inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etopósido y teniposida, amsacrina, topotecán y camptotecinas);

(ii) agentes citostáticos tal como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores hacia abajo de los receptores de estrógenos (por ejemplo fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de la aromatasa (por ejemplo como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) y los inhibidores de la 5 α -reductasa como finasteride;

(iii) agentes que inhiben la invasión de las células del cáncer (por ejemplo los inhibidores de metaloproteinasas como marimastat e inhibidores de la función del receptor activador del plasminógeno de la uroquinasa);

(iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo tales inhibidores incluyen los anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbb2 trastuzumab y el anticuerpo anti-erbb1 cetuximab [C225]), inhibidores de la farnesil transferasa, inhibidores de la tirosina quinasa e inhibidores de serina/treonina quinasa, por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo inhibidores de la tirosina quinasa de la familia de EGFR tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-

etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo los inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y por ejemplo los inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos;

(v) agentes antiangiogénicos, tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo el anticuerpo del factor de crecimiento de células endoteliales anti-vascular bevacizumab, compuestos tales como aquellos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354 cada una de las cuales es incorporada aquí en su totalidad) y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha v \beta 3$ y angiostatina);

(vi) agentes perjudiciales vasculares como Combretastatin A4 y compuestos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213 (cada una de las cuales es incorporada aquí en su totalidad);

(vii) terapias antisentido, por ejemplo aquellas que son dirigidas a los objetivos listados anteriormente, tal como ISIS 2503, una antisentido anti-ras;

(viii) aproximaciones a la terapia génica, incluyendo por ejemplo aproximaciones para reemplazar los genes aberrantes tal como las aproximaciones aberrantes p53 o la BRCA1 o BRCA2, GDEPT aberrantes (terapia con profármacos de enzimas dirigidas a los genes) tal como aquellas que usan citosina deaminasa, timidina quinasa o una enzima nitroreductasa bacteriana y aproximaciones para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o la radioterapia tal como la resistencia a múltiples drogas de la terapia génica; y

(ix) aproximaciones inmunoterapéuticas, incluyendo por ejemplo aproximaciones ex vivo e in vivo para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tal como la transfección con citocinas como la interleucina 2, interleucina 4 o el factor

estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, aproximaciones para disminuir la anergia de células T, aproximaciones usando células inmunes transfectadas como las células dendríticas transfectadas de citoquinas, aproximaciones usando líneas celulares tumorales transfectadas de citoquinas y aproximaciones usando anticuerpos anti-idiotípicos;

Un miembro de unión de la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores pueden ser usados en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo, y en correspondencia puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas pueden ser usadas para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes por diferentes rutas por ejemplo administración oral y parenteral.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden ser administradas a los mamíferos. La administración es normalmente en una cantidad "terapéuticamente efectiva", esta siendo suficiente para mostrar beneficios al paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad actual administrada, y la tasa y curso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de que es lo que está siendo tratado, el mamífero particular que está siendo tratado, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega de la composición, el tipo de miembro de unión, el método de administración, el programa de administración y otro factores conocidos por los practicantes médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones en la dosificación etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros doctores en medicina y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o progresión de una enfermedad que está siendo tratada. Las dosis apropiada de anticuerpo son bien conocidos en el arte [83, 84].

Las dosificaciones específicas indicadas aquí o en el Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para el tipo de medicamento que está siendo administrado pueden ser usadas. Una cantidad terapéuticamente efectiva o dosis adecuadas de un miembro de unión de la invención pueden ser determinadas comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Los métodos para la extrapolación de dosificaciones efectivas en ratones y otros animales de prueba a los humanos son conocidos. La dosis precisa dependerá de un número de factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o para tratamiento, el tamaño y la posición del área a ser tratada, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo anticuerpo entero, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier etiqueta detectable u otro molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el rango de 100 μg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 μg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Una dosis de carga mayor inicial, seguida por una o más dosis menores, puede ser administrada. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo entero, por ejemplo el isotipo IgG1. Esta es una dosis para un tratamiento simple de un paciente adulto, la cual puede ser proporcionalmente ajustada para niños e infantes, y también ajustada para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden ser repetidos a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanalmente o mensualmente, a discreción del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para la administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración intravenosa. El tratamiento puede ser periódico, y el período entre administraciones es de alrededor de dos semanas o más, por ejemplo de alrededor de tres semanas o más, de alrededor de cuatro semanas o más, de alrededor de una vez al mes. El tratamiento puede ser dado antes, y/o después de la cirugía, y/o pueden ser administrados o aplicados directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico. Los miembros de unión de la invención pueden ser usados *ex vivo* para determinar el nivel de CXCL13 en una muestra como es

descrito aquí. Un método de este tipo generalmente comprende contactar la muestra con un miembro de unión de la invención bajo condiciones que permiten la unión del miembro de unión al CXCL13 y medir el nivel de enlace de CXCL13 en la muestra. El nivel de CXCL13 puede ser comparado con un estándar o control adecuados.

El método puede ser usado para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o afección en el individuo del que ha sido obtenida la muestra, y para el que los niveles de CXCL13 son predictivos.

Por ejemplo, el método puede ser usado para diagnosticar o pronosticar la gravedad de la enfermedad en, artritis reumatoide, un método de este tipo comprende determinar el nivel de CXCL13 en una muestra adecuada, por ejemplo una muestra de fluido sinovial o suero, obtenido de un individuo que padece de o sospechoso de estar padeciendo de artritis reumatoide. Los niveles elevados de CXCL13 comparado con una muestra control son indicativos de la enfermedad, y existe una correlación positiva entre los niveles de CXCL13 y la gravedad de la enfermedad.

Ejemplos

Materiales y Métodos de Ensayo

Materiales

Células CHO Gqi5: células CHO K1 que expresan la proteína G Gqi5 (SEQ ID NO: 19).

células CHO Gqi5 hCXCR5 o células CHO Gqi5 hCXCR5 c4.4: células CHO Gqi5 que expresan establemente el CXCR5 humano (SEQ ID NO: 17)

Medio esencial mínimo (Gibco 31095)

1% Aminoácidos no esenciales (Gibco 11140)

Medio de ensayo para el ensayo AMPc HTRF®:

Medio esencial mínimo (Gibco 31095) conteniendo

0.5mM 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma I7018)

1% Aminoácidos no esenciales (Gibco 11140)

0.1% BSA

Solución AMPc-XL665 para el ensayo HTRF: una solución que comprende XL665 (un colorante aloficocianina, 80kD de tamaño, acoplado directamente al AMPc)

Buffer de Lisis Conjugado para el ensayo HTRF AMPc

Solución de Criptato de Europio Anti-AMPc para el ensayo HTRF

Solución de Sal Balanceada de Hanks (Sigma H8264)

Medio de Ensayo para el Ensayo AMPc LANCE®:

Solución de Sal Balanceada de Hanks (Sigma H8264) conteniendo 5mM HEPES pH7.4

0.5 mM 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma I7018)

0.1% BSA

Anticuerpo anti-AMPc acoplado a Alexa Fluor®-647 para el Ensayo AMPc LANCE®: un anticuerpo específico AMPc marcado con el colorante Alexa Fluor®-647, formulado en solución salada de 50mM Tris HCl (pH7.8), 0.9% cloruro de sodio, 0.1%BSA, 0.05% azida de sodio (preservante).

Mezcla de detección LANCE®

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen)

Aminoácidos no esenciales-MEM sin L-glutamina (Invitrogen)

Medio de ensayo de Liberación de Ca²⁺ inducida por CXCL13:

Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% (v/v) Suero fetal de bovino (FBS) inactivado por calor (Invitrogen)

1% (v/v) Aminoácidos no esenciales-MEM sin L-glutamina
(Invitrogen)

*Solución de carga del colorante para el ensayo de Liberación de
Ca²⁺ inducida por CXCL13*

*Mezcla del colorante Fluo-4 NW para el ensayo de Liberación de
Ca²⁺ inducida por CXCL13*

buffer FLIPR:

125 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl₂

1.5 mM CaCl₂

30 mM Hepes

2.5 mM probenecid (4-(dipropilsulfamoyl) ácido benzoico) 5 mM
glucosa

1% (v/v) FBS inactivado por calor

Células B300.19 hCXCR5: Una línea celular pre-B murina
establemente transfectada con CXCR5 humano

*Medio de cultivo para el ensayo de quimiotaxia con células
B300.19 hCXCR5: (RPMI-1640 Sigma, Cat# R0883), conteniendo 10%
suero fetal de ternero (FCS); 1% pencilina, estreptomycin y
glutamina (PSG); 1% piruvato de sodio; 1.5 µg/ml puramicina y 0.1%
2-β-mercaptoetanol.*

Métodos

Ensayo de unión ligando-receptor CXCL13 (FMAT)

El ensayo de unión del ligando al receptor de CXCL13 mide la interacción entre el CXCL13 humano biotinilado (Almac) y el receptor CXCR5 sobreexpresado en células B300.19 (Almac) usando la Tecnología de Ensayo de Microvolumen de Fluorescencia (FMAT) (Dietz y otros 1996, Miraglia y otros 1999, Mellentin-Michelotti y otros. 1999). Este ensayo puede ser usado para seleccionar los

extractos periplásmicos de scFv crudos o scFv purificados para la inhibición de la interacción CXCL13: CXCR5.

Los rendimientos de selección fueron seleccionados como extractos periplásmicos conteniendo scFv crudos diluidos preparados en 200 mM Tris buffer pH7.4, 0.5 M Sucrosa. Todas las diluciones de las muestras y reactivos fueron llevadas a cabo en Solución de Sal Balanceada de Hanks (Sigma H8264) conteniendo 0.025% Albúmina de Suero Bovino (BSA) y 0.01% Azida de Sodio. Las muestras diluidas (20 µL) fueron incubadas con 1 nM CXCL13 humano biotinilado, 25 ng/mL estreptavidina FMAT-Blue (Applied Biosystems 4362492) y células B300.19 CXCR5 (4000 células/pocillos) durante 2 horas a temperatura ambiente en un volumen de ensayo total de 50 µL en una placa de superficie no unida de fondo claro de 384 pocillos (Costar 3655). Los controles de unión total y unión no específica (NSB) fueron establecidos usando un buffer de ensayo o anticuerpo monoclonal CXCL13 anti-humano con una concentración final del ensayo de 3 nM (R&D Systems MAB801) respectivamente. Las placas fueron leídas en el Sistema de Detección Celular 8200 de Applied Biosystems y los datos analizados usando el algoritmo de Wang Goldman con activación de puerta FL1<1600, tamaño <15 y relación de color <0.4.

El % de unión específica como se determinó a partir del dato FL1 Total usando la ecuación 1 donde NSB FL1 Total es el valor promedio de los pocillos de control de unión específica y el Total de FL1 de unión Total es el valor promedio de los pocillos de control de unión Total.

Ecuación 1:

$$\% \text{ de unión específica} = \frac{(\text{Muestra FL1 Total} - \text{NSB FL1 Total})}{(\text{Total de FL1 de unión Total} - \text{NSB FL1 Total})} \times 100$$

MD

Ensayo AMPc HTRF®

Los niveles de 3',5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) en células son aumentados a través de la activación de la familia de las enzimas adenilil ciclasa, las que catalizan la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) a AMPc y pirofosfato. La unión de CXCL13 a su receptor CXCR5 acoplado a la proteína G puede resultar en una regulación hacia abajo de la actividad de la adenilil ciclasa y de ahí la disminución en los niveles de AMPc celular a través de la liberación de la subunidad $G_{\alpha i}$ de la proteína G, que inhibe la adenilil ciclasa.

Se usó el kit de ensayo AMPc HTRF® (Fluorescencia Homogénea Resuelta en Tiempo) (CisBio International 62AM4PEC) para la determinación de los niveles celulares de AMPc. En el ensayo de AMPc HTRF® estimulado por CXCL13, las disminuciones mediadas por CXCL13 en los niveles de AMPc en las células CHO Gqi5 que expresan establemente CXCR5 son medidos.

La co-estimulación de las células con el activador de la adenilil ciclasa, NKH477 (Tocris Cookson 1603), un derivado de foscolina soluble en agua, es llevada a cabo para asegurar la respuesta de CXCL13 está dentro del rango lineal de detección del kit de ensayo de AMPc HTRF®.

Este ensayo puede ser usado para determinar las potencias de scFv para la inhibición de la modulación mediada por CXCL13 de los niveles celulares de AMPc en células CHO Gqi5 hCXCR5.

Las muestras de ScFv, los reactivos y las células CHO Gqi5 hCXCR5 fueron preparadas en un medio de Ensayo (Medio esencial mínimo (Gibco 31095) conteniendo 0.5mM 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma I7018), 1% Aminoácidos no esenciales (Gibco 11140) y 0.1% BSA) a menos que otra cosa sea declarada. Las células CHO Gqi5 hCXCR5 fueron cultivadas a partir de frascos de cultivo de tejido y resuspendidas a 1.2×10^6 células/ml en el Medio de Ensayo. El Criptato de Europio Anti-AMPc y AMPc-XL665 fueron reconstituidos

/111

en agua destilada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (CisBio International).

Los ScFv fueron pre-incubados con 4 nM de CXCL13 humano (SEQ ID NO: 14) o cinomólogo (SEQ ID NO: 16) (célula derivada de MEL) durante 30 minutos a temperatura ambiente en una placa de bajo volumen de 384 pocillos (Costar 3676). 5 µl de la muestra pre-incubada fueron transferidos a la placa de ensayo (Costar 3676), luego 2.5 µl NKH477 y 2.5 µl CHO Gqi5 hCXCR5 de suspensión celular adicionados para dar un volumen de reacción final de 10 µl conteniendo 0.5 µM NKH477 y 3000 células/pocillos. Cada placa fue establecida con los siguientes controles: NKH477 control (células CHO Gqi5 hCXCR5 con 0.5 µM NKH477), CXCL13 control (2 nM CXCL13, 0.5 µM NKH477 y células CHO Gqi5 hCXCR5), AMPc basal control (células CHO Gqi5 hCXCR5 solamente) y control negativo (medio de Ensayo solamente). Las titulaciones de CXCL13 y NKH477 fueron también corridas en cada experimento para asegurar que las concentraciones usadas en el ensayo estuvieran dentro del rango de EC₅₀-EC₈₅ y por lo tanto dentro del rango lineal de detección del kit de ensayo de AMPc HTRF®. Después de la adición de las células, las placas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego las reacciones detenidas por la adición de 5 µl de solución AMPc-XL665. Esto fue seguido por la adición de 5 µl de Buffer de Lisis Conjugado a los pocillos de control negativo o 5 µl de solución de Criptato de Europio Anti-AMPc a todos los otros pocillos.

Las placas de ensayo fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente, antes de la lectura de fluorescencia resuelta en tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placa EnVision (Perkin Elmer).

Los datos fueron analizados calculando los valores Delta F% para cada muestra. Delta F% como se determinó de acuerdo con la ecuación 2 donde Delta F% de CXCL13 control es el valor promedio

de los pocillos de CXCL13 control y Delta F% de NKH477 control es el valor promedio de los pocillos de NKH477 control.

Ecuación 2:

$$\text{Delta F\%} = \frac{(\text{valor de relación muestra } 665\text{nm}/620\text{nm}) - (\text{valor de relación control negativo } 665\text{nm}/620\text{nm})}{(\text{valor de relación control negativo } 665\text{nm}/620\text{nm})} \times 100$$

Los valores % Delta F fueron posteriormente usados para calcular el % de inhibición como es descrito en la ecuación 3.

Ecuación 3:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{Delta F \% de la muestra} - \text{Delta F \% CXCL13 control})}{(\text{Delta F \% NKH477 control} - \text{Delta F \% CXCL13 Control})} \times 100$$

Una titulación de las concentraciones de scFv fue usada para establecer la potencia del clon como se midió por los valores IC_{50} en el ensayo. Los valores IC_{50} fueron determinados usando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curva usando una ecuación lógica de cuatro parámetros (Ecuación 4).

Ecuación 4:

$$Y = \text{Fondo} + (\text{Tope} - \text{Fondo}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{pendiente})})$$

X es el logaritmo de la concentración. Y es el % de inhibición

Ensayo de AMPc LANCE® estimulado por CXCL13

El principio del ensayo de AMPc LANCE® estimulado por CXCL13 es comparable a aquel puntualizado para el ensayo de AMPc HTRF® estimulado por CXCL13 pero los niveles celulares de AMPc son medidos usando el kit de ensayo AMPc LANCE® (Perkin Elmer AD0263). El ensayo de AMPc LANCE® estimulado por CXCL13 puede ser usado para determinar la potencia de IgG para la inhibición de

las disminuciones mediadas por CXCL13 en los niveles de AMPc en células CHO Gqi5 hCXCR5 tras la co-estimulación con NKH477.

Todas las diluciones fueron llevadas a cabo en Medio de Ensayo (Solución de Sal Balanceada de Hanks (Sigma H8264) conteniendo 5mM HEPES pH7.4, 0.5 mM 3-Isobutil-1-metilxantina (Sigma I7018) y 0.1% BSA) a menos que otra cosa sea declarada. Las células CHO Gqi5 hCXCR5 fueron cultivadas a partir de frascos de cultivo de tejido y resuspendidas a 1.2×10^6 células/ml en Medio de Ensayo. El anticuerpo anti-AMPc acoplado a Alexa Fluor®-647 fue adicionado a la suspensión celular a una dilución de 1:100. La mezcla de detección LANCE® conteniendo 1:2250 Europio-W8044 diluido Estreptavidina y 1:750 veces Biotina diluida-AMPc fue preparada al menos 15 minutos antes del uso según las instrucciones del fabricante. El Europio-W8044 es un quelato de europio con rama reactiva de DCA (diclorotriazinil).

Las muestras de IgG fueron pre-incubadas con 4 nM CXCL13 humano (SEQ ID NO: 14) o cinomólogo (SEQ ID NO: 16) (derivado de células MEL) y 2 μ M NKH477 (Tocris Cookson 1603) durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa de bajo volumen de 384 pocillos (Costar 3676). 5 μ L de la muestra pre-incubada fueron transferidos a una placa de ensayo de 384 pocillos blanca Proxiplate Plus (Perkin Elmer Cat no. 6008280). La suspensión del anticuerpo anti-AMPc Alexa Fluor®-647/células CHO Gqi5 hCXCR5 (5 μ L) fue adicionado para dar un volumen de reacción final de 10 μ L conteniendo 1 μ M NKH477, 3000 células CHO Gqi5 hCXCR5/pocillos y 1:200 anticuerpo anti-AMPc acoplado a Alexa Fluor®-647 diluido. Cada placa fue establecida con los siguientes controles: NKH477 control (células CHO Gqi5 hCXCR5/anticuerpo anti-AMPc acoplado a Alexa Fluor®-647 y 1 μ M NKH477) y CXCL13 control (2 nM CXCL13, 1 μ M NKH477 y células CHO Gqi5 hCXCR5/anticuerpo anti-AMPc acoplado a Alexa Fluor®-647). Las titulaciones de CXCL13 y NKH477 fueron también corridas en cada experimento para asegurar que las concentraciones usadas en el ensayo estuvieran dentro del rango

EC₅₀-EC₈₅ y por lo tanto dentro del rango lineal de detección del kit de ensayo AMPc LANCE®. Después de la adición de la suspensión celular las placas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego las reacciones detenidas por la adición de 10 µL de mezcla de detección LANCE® a todos los pocillos del ensayo. Las placas fueron incubadas durante 3 horas a temperatura ambiente y luego la emisión a una longitud de onda de 665 nm determinada usando un lector de placa EnVision (Perkin Elmer).

El dato de emisión a 665nm fue usado para calcular el % de inhibición como es descrito en la ecuación 7, donde la emisión a 665nm de CXCL13 control es el valor promedio de los pocillos de CXCL13 control y la emisión a 665nm del NKH477 control es el valor promedio de los pocillos de NKH477 control.

Ecuación 7:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{emisión a 665nm de la muestra} - \text{emisión a 665nm de CXCL13 control})}{(\text{emisión a 665nm de NKH477 control} - \text{emisión a 665nm de CXCL13 control})} \times 100$$

Los valores IC₅₀ fueron determinados usando un software GraphPad Prism por ajuste de curva usando una ecuación lógica de cuatro parámetros (ver Ecuación 4).

Ensayo de Liberación de Ca²⁺ inducida por CXCL13 CHO Gqi5 hCXCR5 c4.4

Las células CHO Gqi5 hCXCR5 c4.4 fueron sembradas en placas de ensayo de cultivo de tejido tratadas con Poli-D-Lisina de paredes negras de 96 pocillos (BD) a 1x10⁵ células/pocillos. Las células fueron entonces cultivadas toda la noche en 100 µL de medio de Ensayo (Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen), 10% (v/v) suero fetal de bovino (FBS) inactivado por calor (Invitrogen), 1% (v/v) Aminoácidos no esenciales-MEM sin L-glutamina (Invitrogen)) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂.

115

Un protocolo FLIPR sin lavado fue empleado como sigue, usando un kit comercialmente disponible (Fluo-4 Kit de Ensayo de Calcio sin lavado F36206, Molecular Probes). La solución de carga del colorante fue preparada adicionando 10 ml de Buffer de ensayo (20mM HEPES en 1X Solución de Sal Balanceada de Hanks) y 100 μ l solución padre de probenecid (250mM en Buffer de ensayo) a un vial simple de mezcla de colorante Fluo-4 NW. El medio fue aspirado de las células, y 70 μ l/pocillo de solución de carga del colorante fue adicionada e incubada a 37°C durante 30 minutos, seguido por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este período de incubación, las titulaciones de los IgG purificados fueron preparadas en buffer FLIPR (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 30 mM Hepes, 2.5 mM probenecid, 5 mM glucosa y 1% (v/v) FBS inactivado por calor) y pre-incubadas con CXCL13 (100 nM concentración final) también en buffer FLIPR durante 30 minutos a 37°C.

Después de la incubación, las respuestas de las células marcadas a las titulaciones CXCL13/IgG fueron medidas en el Sistema Lector de Placa de Imagen de Fluorescencia (FLIPR). La fluorescencia del colorante sensible al calcio intracelular fue ensayada usando un filtro de excitación de 470 a 495nm y un filtro de emisión de 515 a 575nm durante un período de lectura de x 120 segundos.

El dato fue analizado exportando la altura máxima del pico para cada pocillo a Excel (Microsoft). El dato del inhibidor fue normalizado al porcentaje del Ca²⁺ intracelular inducido por el CXCL13 usando la respuesta a CXCL13 en ausencia de inhibidor, y sustrayendo la respuesta al buffer de ensayo solo. Otro análisis fue realizado en Prism (GraphPad) donde los datos fueron trazados como porcentaje de la respuesta control contra el log de la concentración de IgG. Los valores IC₅₀ fueron calculados usando el software de ajuste de curva Prism (Graphpad).

116

Ensayo de Inmunoabsorbencia ligado a la Fluorescencia (FLISA) de CXCL13

El FLISA de CXCL13 mide la interacción entre el CXCL13 humano biotinilado (Almac) acoplado a una perla de Estreptavidina y los miembros de unión de CXCL13 en el formato IgG usando la Tecnología de Ensayo de Microvolumen de Fluorescencia (Dietz y otros 1996, Swartzman y otros 1999). Este ensayo puede ser usado para determinar la especificidad de los IgG para el CXCL13 humano biotinilado comparado con los miembros de la familia de la quimoquina relacionados en un formato de ensayo de competencia.

Las muestras y los reactivos fueron diluidos en Buffer de ensayo (Buffer de Fosfato Salino con 0.1% BSA, 0.1% Tween-20 y 0.01% azida de sodio). 0.25 nM de CXCL13 biotinilado (Almac) fueron pre-incubados con 0.004% p/v 6-8 μ m estreptavidina recubierta con partículas de poliestireno (SpheroTec SVP-60-5) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas fueron entonces centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante desechado y la pellet resuspendida en el volumen original del buffer de ensayo para dar una mezcla de 0.004% p/v perla/CXCL13 humano biotinilado. 10 μ L del buffer de ensayo competidor (control de unión total) o CXCL13 humano en exceso (control de unión no específica (NSB)) fue adicionado a una placa de ensayo de superficie no unida de fondo claro de 384 pocillos (Costar 3655). 10 μ L 5 nM Cabra anti-humana (H+L) conjugada con Alexa Fluor®-647 (Invitrogen A21445), 10 μ L 0.31 nM Anticuerpo 1 (alineado germinalmente IgG) y 20 μ L mezcla perla/CXCL13 biotinilado fueron luego adicionados las placas incubadas durante 4 horas a temperatura ambiente. La señal FL1 fue leída en el Sistema de Detección Celular 8200 de Applied Biosystems. El dato fue analizado usando el algoritmo de Wang Goldman con activación de puerta de tamaño 3-12, relación de color <0.4, conteo mínimo 20.

El % de unión específica como se determinó a partir del dato de FL1 usando la ecuación 8, donde NSB FL1 es el valor promedio de los pocillos de control de unión no específica y FL1 de unión

117

Total es el valor promedio de los pocillos de control de unión Total.

Ecuación 8:

$$\% \text{ unión específica} = \frac{(\text{FL1 Muestra} - \text{FL1 NSB})}{(\text{FL1 de unión total} - \text{FL1 NSB})} \times 100$$

Los valores IC₅₀ fueron determinados usando el software GraphPad Prism por ajuste de curva usando una ecuación lógica de cuatro parámetros (ver Ecuación 4).

Evaluación por BIAcore de la interacción del Anticuerpo 1 (IgG alineado germinalmente) con el CXCL13 cinomólogo y humano

Reactivos:

CXCL13

CXCL13 humano (expresado en célula MEL)

0.1 mg mL⁻¹, masa promedio esperada 9,694.53 Da, 10.31 μM.

Dilución to 6 nM was 4 μL en 6,869 μL HBS-EP.

El CXCL13 cinomólogo (expresado en célula MEL)

0.6 mg mL⁻¹ diluido a 0.3 mg mL⁻¹, masa promedio esperada 9,670 Da, 31.02 μM). La dilución a 6 nM fue 4 μL en 20,678 μL HBS-EP.

Inmunoglobulinas

Anticuerpo 1 (Alineado germinalmente)

4.42 mg mL⁻¹ (por ejemplo 3a); 1.06 mg mL⁻¹ (por ejemplo 3b)

Metodología para el ejemplo 3a

Ver ejemplo 3a para la preparación del chip.

Para cada ciclo experimental (orientación 1) la superficie G' de la Proteína Fc 2 fue usada para capturar el Anticuerpo 1 240-385 RU (IgG₁ alineado germinalmente) titulando una solución de Anticuerpo 1 0.5 μL mL⁻¹ HBS-EP (IgG₁ alineado germinalmente) a 5 μL min⁻¹ durante 2 minutos.

Una dilución especificada de CXCL13 cinomólogo y humano (0.25, 0.3125, 0.50, 0.625, 1.0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 nM para el CXCL13 humano ó 0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 y

40.0 nM para el CXCL13 cinomólogo) en buffer HBS-EP fue entonces fluido sobre la superficie del chip a una tasa de flujo de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ (tiempo de asociación de 2.5 minutos, disociación durante 10 minutos y regeneración con un pulso $20 \mu\text{L}$ de 10 mM Glicina pH 1.75 seguido por un pulso $20 \mu\text{L}$ de 10 mM Glicina pH 1.50). Las inyecciones patrón fueron hechas con el HBS-EP solo. Todas las soluciones fueron preparadas y almacenadas en polipropileno.

Metodología para el ejemplo 3b

Los anticuerpos fueron diluidos a $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 10 mM buffer de acetato pH 4.5. La química de enlace amina estándar (usando el kit de acoplamiento amina BR-1000-50) fue empleada para crear el patrón (Fc 1) y 500 superficies RU de IgG sobre un chip CM3 (BIAcore, BR-1005-41, lote: 1160100 expira Abril '07). La solución de lavado empleada fue Glicina pH 2.0.

Flujo de CXCL13 cinomólogo y humano sobre las superficies del chip.

Una serie de diluciones de cada CXCL13 (0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60 nM) fueron construidas en buffer HBS-EP y fluyeron a $30 \mu\text{L min}^{-1}$ sobre todas las celdas de flujo (tiempo de asociación de 4 minutos, disociación durante 10 minutos y regeneración con dos pulsos $20 \mu\text{L}$ de 10 mM Glicina pH 2.0). Las inyecciones patrón fueron hechas con el mismo buffer. Todas las soluciones fueron preparadas y almacenadas en polipropileno.

Cambio de formato de scFv a IgG₁

Los clones fueron convertidos del formato scFv a IgG subclonando los dominios VH y VL en los vectores que expresan todas las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo respectivamente. El dominio VH fue clonado en un vector (pEU15.1) conteniendo los dominos constantes de cadena pesada humanos y los elementos regulatorios para expresar la cadena pesada de IgG₁ completa en células de mamíferos. De manera similar, el dominio VL fue clonado en un vector para la expresión de los dominos constantes

de cadena ligera humana y los elementos regulatorios para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamíferos (cadenas ligeras pEU3.4 para kappa, pEU4.4 para lambda). Los vectores para la expresión de las cadenas pesadas y cadenas ligeras fueron originalmente descritos en Persic y otros, 1997. Los vectores han sido manipulados para permitir la replicación episomal de los vectores.

Para obtener los IgG, los vectores de expresión de IgG de cadena pesada y de cadena ligera fueron transfectados en células de mamíferos EBNA-HEK293. Los IgG fueron expresados y secretados en el medio libre de suero. Los cultivos fueron combinados y filtrados antes de la purificación. El IgG fue purificado usando cromatografía de la Proteína A. Los sobrenadantes del cultivo son cargados en una columna de tamaño apropiado de Proteína A Cerámica (BioSeptra) y lavados con 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl. El IgG unido fue eluido de la columna usando 0.1 M Citrato de Sodio (pH 3.0) y neutralizado por la adición de Tris-HCl (pH 9.0). El material eluido fue intercambiado con buffer en PBS usando columnas Nap10 (Amersham, #17-0854-02) y la concentración de IgG como se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de IgG (Mach 1992). Los IgG purificados fueron analizados para la agregación o degradación usando SEC-HPLC y por SDS-PAGE.

Ensayo de competencia del epítipo HTRF®

El ensayo de competencia del epítipo HTRF® puede ser usado para determinar la competencia entre los miembros de unión para el CXCL13 de unión biotinilado. Las moléculas de anticuerpos probadas en este ensayo pueden estar por ejemplo en formato scFv o IgG.

Los principios de la tecnología HTRF® son como es descrito aquí.

En un ensayo de competencia del epítipo HTRF® para determinar la capacidad de un miembro de unión para competir para la unión al

CXCL13 con una molécula de anticuerpo scFv que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11, un complejo FRET es formado entre el ScFv marcado con criptato (SEQ ID NO: 11), el CXCL13 humano biotinilado y la estreptavidina XLent (estreptavidina reticulada con XL665, acoplados bajo condiciones optimizadas). Un ScFv o IgG que reconoce el mismo (o posiblemente solapando) epítipo que el ScFv marcado con criptato competirá para la unión al CXCL13 biotinilado y reduce así la señal del ensayo.

Todas las diluciones de las muestras y los reactivos son llevadas a cabo en buffer de ensayo (Buffer de Fosfato Salino, 0.1% BSA, 0.4 M Fluoruro de potasio). El CXCL13 humano biotinilado (AlmacAlmac) y estreptavidina-XLent (CisBio International 611SAXLB) son pre-incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. 10 µL de muestra (scFv o IgG), buffer de ensayo (control de unión total) o 50X de IgG no marcado en la concentración final del ensayo (para definir la unión no específica (NSB)) son adicionados a una placa de bajo volumen de 384 pocillos (Costar 3676) seguido por 5 µL de la mezcla de CXCL13 biotinilado/estreptavidina XLent pre-incubada. Las placas son incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente después de lo cual 5 µL de ScFv marcado con criptato es adicionado. Las placas son incubadas durante 3 horas a temperatura ambiente antes de la determinación de la fluorescencia resuelta en tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placa EnVision (Perkin Elmer).

Las concentraciones óptimas de CXCL13, la estreptavidina-XLent y el IgG marcado con criptato pueden ser tituladas para establecer la concentración de cada reactivo que da una señal del ensayo apropiada.

El dato es analizado calculando los valores Delta F% para cada muestra (se refiere a la ecuación 5).

Ecuación 5:

$$\text{Delta F\%} = \frac{(\text{relación 665nm/620nm de la muestra}) - (\text{relación 665nm/620nm NSB})}{(\text{relación 665nm/620nm NSB})} \times 100$$

Los valores Delta F% son posteriormente usados para calcular el % de unión específico como es descrito en la ecuación 6, donde Delta F% NSB es el valor promedio de los pocillos control de unión no específica y Delta F % de unión Total es el valor promedio de los pocillos control de unión total.

Ecuación 6:

$$\% \text{ unión específica} = \frac{(\text{Delta F\% Muestra} - \text{Delta F\% NSB})}{(\text{Delta F\% de unión Total} - \text{Delta F\% NSB})} \times 100$$

Los valores IC₅₀ son determinados usando el software GraphPad Prism por ajuste de curvas usando una ecuación lógica de cuatro parámetros (ver Ecuación 4).

Ecuación 4 :

$$Y = \text{Fondo} + (\text{Tope} - \text{Fondo}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{pendiente}))}$$

X es el logaritmo de la concentración. Y es el % de inhibición

Ensayo de quimiotaxia conducido por CXCL13 con células B300.19 hCXCR5

Las células B300.19 hCXCR5 fueron ajustadas a 5×10^5 células/ml durante al menos 2 días antes de correr el ensayo usando medio de cultivo (RPMI-1640 Sigma, Cat# R0883) conteniendo 10% suero fetal de ternero (FCS); 1% penicilina, estreptomicina y glutamina (PSG); 1% piruvato de sodio; 1.5 µg/ml puramicina y 0.1% 2-β-mercaptoetanol en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% CO₂. El día del ensayo, las células B300.19 hCXCR5 fueron contadas y ajustadas a 6×10^6 células/ml después de haber sido rotadas hacia abajo y lavadas una vez en buffer (RPMI-1640 (Sigma Cat# R0883) + 0.35% BSA (Sigma Cat# A2153)).

Las titulaciones de IgG fueron hechas en buffer de ensayo. Los IgG fueron pre-incubados con una concentración ED80 de CXCL13 durante 30 min en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% CO₂.

Después de este período de incubación, 31 µl/pocillo de CXCL13 pre-incubado y IgG fueron transferidos a la cámara más baja de una placa de quimiotaxia (Receptor Technologies, Cat# 106-5) usando pipeteo inverso para evitar las burbujas. El filtro de membrana fue entonces aplicado sobre los pocillos asegurando cada esquina. 50µl de las células B300.19 hCXCR5 (6x10⁶ células/ml) fueron luego dispensadas en áreas circuladas en la cámara superior del filtro de quimiotaxia. La tapa fue colocada sobre la placa de quimiotaxia e incubado en una atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂) durante 2hr.

Después de 2hr de incubación, las placas fueron eliminadas de la incubadora y lavadas para eliminar el exceso de células de la superficie del filtro. Esto fue hecho virtiendo PBS sobre la superficie de la membrana y usando un raspador de células (Corning, Cat# 3011) para eliminar todo el exceso de células/PBS. La placa de quimiotaxia fue luego centrifugada a 1500rpm durante 10 min, dejando el filtro.

A continuación de la rotación, el membrana del filtro fue eliminada y los contenidos de la cámara inferior de la placa de quimiotaxia fueron transferidos a una placa de fondo plano de poliestireno de 96 pocillos (Corning, Cat# 3598) (placa enzimática placa) conteniendo 80µl/pocillo de buffer de ensayo y 15µl/pocillo de buffer de lisis (H₂O + 9% Triton-X). La placa fue incubada durante 1hr en una atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂).

Cada placa fue luego sometida a un ensayo de citotoxicidad no radioactivo que mide la lactato dehidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable, liberada de la lisis celular. El ensayo proporciona una medida cuantitativa del número de células. El ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 (Promega Cat#

G1780) consiste en los siguientes reactivos: 5 viales de Mezcla del Sustrato; 60ml Buffer de ensayo; 25 μ l LDH Control Positivo (NO USADO); 3ml solución de lisis (10X) (NO USADO); 65ml solución de parada (1M Ácido Acético); 1 protocolo. Para la medición LDH el Buffer de ensayo fue descongelado; 12ml fueron eliminados y la porción no usada almacenada de inmediato a -20°C. A 37°C el baño de agua puede ser usado para descongelar el buffer de ensayo. Los 12ml del Buffer de ensayo fueron calentados a temperatura ambiente (se mantiene protegido de la luz). Los 12ml del Buffer de ensayo a temperatura ambiente fue adicionado a una botella de la Mezcla del Sustrato. Esta fue invertida y agitada suavemente para disolver la Mezcla del Sustrato.

Una botella suministrará suficiente sustrato para dos placas de 96 pocillos. Una vez resuspendido, el sustrato debe ser protegido de la luz fuerte directa y usado inmediatamente. 50 μ l de la Mezcla del Sustrato reconstituida fue adicionada a cada pocillo de la placa de ensayo enzimática conteniendo muestras lisadas transferidas de la placa de ensayo de quimiotaxia. La placa fue cubierta con foil o una caja opaca para protegerla de la luz e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. 50 μ l de la Solución de parada fueron adicionados a cada pocillo. Cualquiera de las burbujas grandes fue reventada usando una aguja de jeringuilla, y la absorbancia a 490 ó 492nm dentro de 1 hora después de la adición de la Solución de parada fue registrada.

El dato fue cargado en el GraphPad Prism 4 y este software generó los valores IC₅₀ basados en las curvas de dosis respuesta generadas.

Ensayo de Quimiotaxia conducido por CXCL13 en Células B de Amígdalas Humanas

Las amígdalas humanas fueron obtenidas después de una cirugía de las amígdalas de pacientes bajo aprobación del comité de ética local. Las muestras fueron transportadas en medio RPMI-1640 (Sigma: R0883) conteniendo 10% Suero fetal de ternero, 1%

Pencilina (10,000unidades/ml) + Estreptomicina (10mg/ml) + solución de Glutamina (200mM) (Sigma: G1146) para dar una concentración final de 100Unidades/ml Pencilina + 0.1mg/ml Estreptomicina + 2mM solución de Glutamina, 100µg/ml Gentamicina (Sigma: G1522), 0.1% Beta mercaptoetanol (Gibco: 31350-010), 1% Piruvato de sodio (Sigma: S8636), 1% Aminoácidos No Esenciales (Gibco: 11140-035).

Las células B de las amígdalas primarias fueron aisladas del tejido de la amígdala usando un tamiz de disociación de células (tamaño de 60 pulgadas) (Sigma: CD1). La suspensión celular fue luego lavada por centrifugación a 300g (1500rpm) durante 5 min. El sobrenadante fue desechado y la pelletilla de células resuspendida en un total de 20ml de medio de cultivo de tejido frío. La suspensión celular fue distribuida en capa sobre 20ml de Ficoll hypaque (Lymphoprep) (Axis Shields: 1114544) y centrifugada a 2000rpm durante 15 min para eliminar las células muertas, restos de células y eritrocitos. Las células en la interface del lymphoprep y medio de cultivo de tejido fueron eliminadas con una pipeta pasteur plástica y transferidos a un tubo centrifuga de 15ml. La suspensión celular fue hecha hasta un volumen de 15ml con medio de cultivo de tejido frío y centrifugada a 1500rpm durante 5 mins. El sobrenadante fue desechado y la pelletilla de células resuspendida en 10ml de medio de cultivo de tejido frío. Un conteo de células viable es realizado usando un contador de Coulter. Las células fueron ajustadas a una concentración de 5×10^6 células por ml y cultivadas toda la noche con 1µg/ml LPS aproximadamente 20hr.

Después de la incubación las células de las amígdalas fueron ajustadas a 1×10^7 células/ml después de haber sido rotadas hacia abajo y lavadas una vez en buffer (RPMI-1640 (Sigma Cat# R0883) +0.35% BSA (Sigma Cat# A2153)).

El ensayo de quimiotaxia fue entonces llevado a cabo como se describió previamente para las células B300.19 hCXCR5.

Unión del hCXCL13 Nativo al Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente) en un ELISA

Sangre completa fue recogida en un contenedor heparinizado bajo la aprobación del comité de ética local. La sangre fue lentamente distribuida en capa sobre un volumen igual de Lymphoprep usando un stripette en un tubo Falcon de 50ml. Los tubos fueron rotados a 2000rpm durante 25min a temperatura ambiente con el freno desconectado.

La capa de linfocitos fue eliminada usando una Pipeta Pasteur y transferida en un tubo Fisher fresco de 50ml. Las células fueron entonces lavadas con medio RPMI-1640 pre-calentado (Sigma: R0883). Las células fueron luego lavadas por centrifugación a 1500rpm durante 10min con el freno desconectado. El sobrenadante fue desechado y las células fueron luego lavadas dos veces más por centrifugación usando RPMI a 1500rpm durante 10min con el freno desconectado. Para el lavado final, la pellet fue resuspendida en 50ml de RPMI y una muestra de 200µl eliminada para el conteo usando el Contador de Coulter.

Después del lavado final, las células fueron resuspendidas en la cantidad apropiada de medio de cultivo (RPMI-1640 (Sigma: R0883) conteniendo 10% Suero fetal de ternero, 1% Pencilina (10,000unidades/ml) + Estreptomicina (10mg/ml) + solución de Glutamina (200mM) (Sigma: G1146) para dar una concentración final de 100Unidades/ml Pencilina + 0.1mg/ml Estreptomicina + 2mM Glutamina) para obtener una concentración celular de 3.3×10^6 células/ml.

Las células fueron luego dispensadas en placas de cultivo de tejido de poliestireno de 6 pocillos, 3ml por pocillo. Esto da un número final de células de aproximadamente 1×10^7 células/pocillo. Tantas placas como fue posible fueron establecidas para la estimulación día 6.

Las placas fueron luego incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante 3-4horas. Durante esta incubación los monocitos deben adherirse al fondo de los pocillos dejando otras poblaciones celulares en suspensión. Después de la incubación, los 3ml de medio de cultivo conteniendo células no adherentes fue suavemente extendido de cada pocillo y desechado dejando solamente los monocitos adherentes sobre la base de cada pocillo. A cada pocillo de cada placa, 3ml de medio

de cultivo fresco fue adicionado. Los siguientes estimulantes fueron adicionados:

M-CSF humano (R&D Systems: 216-MC-025) para obtener una concentración final de 50ng/ml + IL-4 humano (R&D Systems: 204-MC-025) para obtener una concentración final de 25ng/ml.

1 pocillo se dejó sin estimular como un control, conteniendo el medio solo.

Después de la estimulación el día 6, a 37°C, 5% CO₂, LPS fue adicionado toda la noche a todos los pocillos estimulados para una concentración final de 1µg/ml. Después de la estimulación con LPS toda la noche, los sobrenadantes fueron tomados de cada pocillo usando un stripette. Todo el sobrenadante fue combinado y luego dispensado en tubos de 15ml (10ml por tubo). ~500µl fue recogido en un tubo eppendorff para la cuantificación por ELISA. La cuantificación de CXCL13 por ELISA fue llevada a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(R&D Systems: Quantikine CXCL13 humano/BLC/BCA-1 Inmunoensayo.

Cat. N°: DCX130)

El sobrenadante conteniendo el CXCL13 nativo fue luego purificado en una resina de intercambio catiónico y dializado en PBS y recuantificado usando ELISA.

Para mostrar la unión de CXCL13 nativo al Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente), las placas de 96 pocillos de alta unión maxi-sorp fueron recubiertas con CAZ-1040 (5µg/ml 200µl por pocillo). También, dentro del kit ELISA, las placas fueron provistas recubiertas con el anticuerpo anti-CXCL-13 no especificado. El CXCL13 nativo purificado fue entonces adicionado a las placas recubiertas con el Anticuerpo 1 y suministradas con el kit. El ELISA fue luego llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems: Quantikine CXCL13 humano/BLC/BCA-1 Inmunoensayo. Cat. N°: DCX130).

El Anticuerpo 1 se une al CXCL13 nativo y CXCL13 recombinante (estándares proporcionados en el kit) con concentraciones equivalentes de ligandos que dan una señal equivalente en el ensayo.

Perturbación de la tasa de intercambio H/D de CXCL-13 por el miembro de unión

El CXCL13 fue usado a 0.5 mg/ml en 50 mM Tris.HCl pH 7.4, 150 mM NaCl. El anticuerpo fue usado a 10.6 mg/ml en PBS (1.54 mM KH_2PO_4 , 2.71 mM Na_2HPO_4 , 155 mM NaCl pH7.2). El anticuerpo fue acoplado a la resina POROS AL (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para preparar una columna 100 μ l que fue mantenida a 1°C.

La columna fue lavada en 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en 75% D_2O . E CXCL13 fue diluido en buffer preparado con 75% D_2O a 0.125 mg/ml e incubado durante 150, 500, 1500 y 5000s antes de la inyección en la columna de anticuerpo. La columna fue rápidamente lavada con 0.2 ml buffer en H_2O y luego incubada durante el mismo período de tiempo es decir la muestra que fue intercambiada en D_2O durante 150s fue intercambiada otra vez con H_2O durante 150s y de manera similar para las muestras a 500, 1500 y 5000s. Los diferentes puntos de tiempo fueron eluidos inyectando primero 80 μ l y luego 40 μ l de ácido fórmico 0.8%. Los últimos 40 μ l fueron recogidos y 20 μ l de urea 2 M, TCEP 1 M pH3 a 1°C adicionados. La mezcla completa fue inyectada en una columna 100 μ l conteniendo pepsina para digerir la proteína en los péptidos que fueron separados por rpHPLC usando un gradiente de acetonitrilo desde 12-28.5% y las masas determinadas en un espectrómetro de masa de electrospray Thermo Finnigan LCQ y un espectrómetro de masa Micromass Q-TOF. El programa de software SEQUEST (Thermo Finnigan San Jose, CA) fue usado para identificar las secuencias de los iones del péptido padre.

El efecto del anticuerpo en la tasa de intercambio de diferentes partes de CXCL13 como se determinó esencialmente como es descrito anteriormente, con las siguientes excepciones: el CXCL13 fue primero diluido a 0.125mg/ml en H_2O conteniendo buffer, luego inyectado en la columna que había sido pre-lavada con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en H_2O . Después de la unión, la columna fue lavada con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl

preparado en H₂O y luego incubado con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en 75% D₂O durante 150, 500, 1500 y 5000s antes de ser intercambiado otra vez en H₂O y tratado como anteriormente.

Ejemplo 1: Aislamiento dirigido al Anticuerpo

ADNc de bazo humano fue usado como patrón para la PCR de marco de lectura abierto de CXCL13 humano. Este fue clonado en un vector de expresión de mamífero (pEV3) para la transfección estable de células MEL. La línea celular MEL clonal que expresa el CXCL13 más alto fue identificada por western blot de los sobrenadantes de cultivo celular usando un anticuerpo anti-CXCL13 comercialmente disponible. El CXCL13 recombinante fue purificado del medio de cultivo de células MEL que expresan la proteína ajustando el pH a 6 y luego cargándolo en una columna de intercambio catiónico. El CXCL13 fue eluido en un buffer MES a pH6 conteniendo 1M NaCl. La muestra fue cargada directamente en una columna Resource rpc y eluida con un gradiente de hasta 90% acetonitrilo en 0.1% TFA. Las fracciones conteniendo CXCL13 fueron combinadas, concentradas y purificadas por cromatografía en una columna Superdex75 para generar material de >95% pureza. La proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE y LCMS y mostró tener una masa de 9690Da.

1.1 Selecciones de la biblioteca de exhibición de fagos de scFv

Bibliotecas de anticuerpo humano Fv de cadena simple grande (scFv) clonados en un vector fagémido basado en fagos filamentosos M13 fueron usados para las selecciones (Vaughan 1996, Hutchings 2001). Los anticuerpos scFv específicos anti-CXCL13 fueron aislados a partir de las bibliotecas de exhibición de fagos usando una serie de ciclos de selección en CXCL13 humano biotinilado químicamente sintetizado (Almac) esencialmente como fue previamente descrito (Vaughan 1996). En resumen los fagos purificados en PBS-Marvel (3% p/v) se dejaron unir al CXCL13 humano biotinilado en solución durante 1 h. Los ScFv-fagos unidos al antígeno fueron entonces capturados en perlas paramagnéticas recubiertas de Estreptavidina (Dynaperlas® M-280) según las

recomendaciones del fabricante. Las partículas de fago no unidas fueron eliminadas por una serie de ciclos de lavado usando PBS-Tween (0.1% v/v) y PBS. Las partículas de fago unidas fueron eluidas, infectadas en la bacteria y rescatadas para la próxima ronda de selección (Vaughan 1996).

Un número representativo de clones individuales a partir de la segunda ronda de selecciones fue crecido en placas de 96 pocillos. Los ScFv fueron expresados en el periplasma bacteriano y seleccionados por su capacidad de inhibir la unión de CXCL13 humano biotinilado (Almac) a su receptor CXCR5 expresado en células B300.19 hCXCR5 usando Tecnología de Ensayo de Microvolumen de Fluorescencia (FMAT). Los ScFv que mostraron un efecto inhibidor significativo como muestras periprep crudas en la interacción CXCL13: CXCR5 en el ensayo fueron sometidas a la secuenciación de ADN (Vaughan 1996, Osbourn 1996).

Los scFv únicos fueron expresados contra bacteria y purificados por cromatografía de afinidad (como es descrito en Bannister 2006). Los valores IC_{50} fueron determinados probando las series de dilución de scFv purificados en un ensayo AMPc HTRF¹ (3', 5' monofosfato de adenosina cíclico) contra el CXCL13 humano y no humano de primate cinomólogo (cino) (ambas células derivadas de MEL).

1.2 Determinación de la actividad funcional. Inhibición de la formación de AMP cíclico estimulado por CXCL13

En el ensayo de AMPc HTRF[®] estimulado por CXCL13 la inhibición por los scFv guías de CXCL13 midió las disminuciones en los niveles de AMPc tras la co-estimulación de las células CHO Gqi5 hCXCR5 con el activador NKH477 de la adenilil ciclasa (0.5 μ M), como se midió. Los valores IC_{50} fueron determinados contra las concentraciones finales de la reacción de 2 nM CXCL13 humano (derivado de células MEL) o 2 nM CXCL13 cinomólogo (derivado de células MEL) (ver Tabla 1). Para detalles del método de ensayo, referirse a la sección "Materiales y Métodos de Ensayo".

Nobre del Clon	CXCL13 humano IC ₅₀ nM ± SD (número n)	CXCL13 Cino IC ₅₀ nM (n=1)
Anticuerpo 1 (germinalmente no alineado)	5 ± 1 (n=3)	3

Tabla 1. Los ejemplos de las potencias del Anticuerpo 1 scFv (germinalmente no alineado) contra el CXCL13 humano (Promedio IC₅₀ ± desviación estándar, número n) o el CXCL13 cinomólogo (n=1 dato solamente) en el ensayo AMPc HTRF® CXCL13

1.3 Potencia de los IgG en el ensayo AMPc LANCE® CXCL13

La actividad de los clones se reformateó para IgG₁ (ver Materiales y Métodos) como se determinó en el ensayo AMPc LANCE®. El principio de este ensayo es comparable a aquel del ensayo AMPc HTRF® pero usa el kit de ensayo AMPc LANCE® (Perkin Elmer) para la determinación de los niveles celulares de AMPc. Para los detalles del método de ensayo, ver la sección "Materiales y Métodos de Ensayo". En el ensayo AMPc LANCE® CXCL13 los valores IC₅₀ para la inhibición IgG de CXCL13 derivado de las células MEL (2 nM CXCL13 humano o 2 nM CXCL13 cino) mediaron las disminuciones en los niveles AMPc tras la co-estimulación de células CHO Gqi5 hCXCR5 con el activador NKH477 de la adenilil ciclasa (1 µM), fueron determinados (para datos por ejemplo ver Tabla 2).

Nombre del clon	CXCL13 humano IC ₅₀ nM ± SD (número n)	CXCL13 Cino IC ₅₀ nM ± SD (número n)
Anticuerpo 1 (IgG no alineado germinalmente)	1.4 ± 0.5 (n=10)	0.3 ± 0.1 (n=6)

Tabla 2. Los ejemplos de potencias del Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente) contra CXCL13 humano derivado de células

de MEL (Promedio $IC_{50} \pm$ desviación estándar, número n) o el CXCL13 cinomólogo (n=6 dato) en el ensayo AMPc LANCE® CXCL13.

1.4 Inhibición de la quimiotaxia inducida por CXCL13 en células B300.19 que expresan CXCR5 recombinante

Los IgG fueron probados en un ensayo de quimiotaxia usando células B300.19 hCXCR5, una línea celular pre-B murina que ha sido transfectada con CXCR5 recombinante humano. Los IgG fueron titulados contra una concentración de CXCL13 humano no glicosilatado que dio aproximadamente una respuesta ED80 (12.32nM). La table a continuación ilustra los valores IC_{50} (nM) $\pm$ SEM para el Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente). Cada IgG fue probado al menos 3 veces.

IgG	IC_{50} (nM $\pm$ SEM)
	hCXCL13 no glicosilatado
Anticuerpo 1 (no alineado germinalmente)	5.26 $\pm$ 0.62

Tabla 3. Ejemplo de valores IC_{50} (nM) $\pm$ SEM para el Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente) en el ensayo de quimiotaxia de B300.19 hCXCR5.

1.5 Inhibición de la liberación de calcio inducida por CXCL13

La actividad IgG en la liberación de calcio inducida por CXCL13 fue evaluada usando una línea celular CHO transfectada con la proteína G Gqi5 y CXCR5 humano. La estimulación de estas células con CXCL13 humano dio lugar a aumentos en el Ca^{2+} citoplásmico en una concentración de manera dependiente induciendo la liberación de los depósitos intracelulares e influjo del medio extracelular. Esto puede ser medido usando colorantes sensibles al calcio en un Lector de Placa de Imagen de Fluorescencia (FLIPR). En este ensayo, la actividad inhibidora, como se determinó por sus valores IC_{50} , de IgG anti-CXCL13 fue determinada contra 100 nM CXCL13 humano (derivado de células MEL). Las potencias IgG

obtenidas para el Anticuerpo 1 (no alineado germinalmente) son mostradas en la Tabla 4. Los controles de ensayo positivo fueron incluidos en todos los ensayos. Para detalles completos del método de ensayo ver "Materiales y Métodos de Ensayo".

Nombre del clon	IgG IC ₅₀ nM (n=8)
Anticuerpo 1 (no alineado germinalmente)	17.1 ± 11.2

Tabla 4. *Potencia del Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente) en el ensayo de Liberación de Ca²⁺ CHO Gqi5 hCXCR5 mediado por CXCL13 (Promedio IC₅₀ ± desviación estándar)*

Ejemplo 2: Alineación germinal del Anticuerpo

2.1 Alineación germinal del Anticuerpo

Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de los anticuerpos anti-CXCL13 fueron alineadas a las secuencias de la línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE (Tomlinson 1997), y la línea germinal más próxima fue identificada por similitud de secuencia. Para los dominios VH del Anticuerpo 1 esta fue VH3-23. Para los dominios VL fue VK1 L12. Sin considerar los residuos de Vernier (Foote 1992), que no se cambiaron, hubo 8 cambios en las regiones marco del dominio VH y 3 cambios en el dominio VL todos los que fueron revertidos a la secuencia de la línea germinal indicada por técnicas de mutagénesis estándar dirigida al sitio usando cebadores mutagénicos apropiados (Q1E, V5L, R16G, V23A, G24A, H39Q, G83R y R105Q en el VH y I15V, A58V y D70E en el VL) para formar el IgG₁ alineado germinalmente.

2.2 Potencia del Anticuerpo 1 IgG Alineado germinalmente en el ensayo AMPC LANCE®

Las potencias del Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente y padre (no alineado germinalmente), para la inhibición de la modulación de CXCL13 humano o cino (derivado de células MEL) de los niveles de AMPC en las células CHO Gqi5 hCXCR5, fueron comparados usando

el ensayo AMPc LANCE® CXCL13 como se puntualizó en la sección 1.3. Los valores IC₅₀ son mostrados en la Tabla 5.

Clones	CXCL13 humano	CXCL13 cino
	IC ₅₀ nM (número n)	IC ₅₀ nM (número n)
Anticuerpo 1 padre	1.4 ± 0.5 (n=10)	0.3 ± 0.1 (n=6)
Anticuerpo 1 Alineado germinalmente	1.6 ± 0.3 (n=4)	0.3 ± 0.1 (n=4)

Tabla 5. Potencia del Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente y padre contra el CXCL13 cinomólogo y humano (Promedio IC₅₀ ± Desviación estándar, número n) en el ensayo AMPc LANCE® CXCL13

El Anticuerpo 1 IgG padre y alineado germinalmente mostró actividades comparables en este ensayo.

2.3 La potencia del Anticuerpo 1 IgG Alineado germinalmente en el ensayo de quimiotaxia usando células B300.19 hCXCR5

Los Anticuerpos 1 IgG completamente alineados germinalmente fueron probados en el ensayo de quimiotaxia usando células B300.19 hCXCR5. Los IgG fueron titulados contra concentraciones ED80 de CXCL13 humano no glicosilatado y glicosilatado y cino glicosilatado. Los resultados son mostrados en la Tabla 6 a continuación como los valores IC₅₀ (nM) ± SEM. Los IgG fueron probados al menos 3 veces.

IgG	IC ₅₀ nM ± SEM		
	CXCL13 humano		CXCL13 cino
	No glicosilatado	Glicosilatado	Glicosilatado
Anticuerpo 1 (alineado germinalmente)	6.22 ± 0.7	3.94 ± 1.5	4.53 ± 0.6

Tabla 6. Ejemplo de los valores IC_{50} (nM) $\pm$ SEM para el Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente en el ensayo de quimiotaxia B300.19 hCXCR5.

2.4 Inhibición de la liberación de calcio inducida por CXCL13 por el Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente

La potencia del Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente y padre (no alineado germinalmente), fue comparada en el ensayo FLIPR como se puntualizó en la sección 1.5.

Nombre del clon	IgG IC_{50} nM $\pm$ SD
Anticuerpo 1 Padre	17.1 $\pm$ 11.2 (n=8)
Anticuerpo 1 Alineado germinalmente	10.4 $\pm$ 6.3 (n=7)

Tabla 7. Los ejemplos de potencias de IgG en el ensayo de liberación de Ca^{2+} CHO Gqi5 hCXCR5 c4.4 mediado por CXCL13 (Promedio IC_{50} $\pm$ Desviación estándar, número n).

2.5 Especificidad del Anticuerpo 1 IgG alineado germinalmente para CXCL13 humano

La especificidad del Anticuerpo 1 IgG₁ alineado germinalmente para el CXCL13 humano (derivado de células MEL) por encima de otros miembros de la familia CXC de quimoquinas como se determinó usando el CXCL13 FLISA (Ensayo de Inmunoabsorbencia ligado a la Fluorescencia). En este ensayo las quimoquinas CXCL3 (R&D Systems), CXCL5 (R&D Systems), CXCL6 (R&D Systems), CXCL8 (R&D Systems), CXCL10 (R&D Systems) y CXCL12 (Peprotech) fueron probadas para la competencia con CXCL13 humano biotinilado (Almac) inmovilizado en una perla de estreptavidina para la unión al Anticuerpo 1 IgG₁ alineado germinalmente. La interacción de unión al anticuerpo CXCL13 humano biotinilado fue detectada con un anticuerpo IgG anti-humano fluorescentemente marcado usando la Tecnología de Ensayo de Microvolumen de Fluorescencia (referirse a "Materiales y Métodos de Ensayo" para los detalles). Los resultados son mostrados en la Tabla 8. Los nombres de quimoquina

estándares (Zlotnik y Yoshie, 2000) son dados junto con su sinónimo más comúnmente usado.

Quimoquina	Inhibición de la unión del Anticuerpo 1 IgG ₁ alineado germinalmente al CXCL13 humano biotinilado IC ₅₀ (nM)
CXCL13 humano (derivado de células MEL)	0.2
CXCL13 cino (derivado de células MEL)	0.8
CXCL3 (GROγ)	>1 μM
CXCL5 (ENA-78)	>1 μM
CXCL6 (GCP-2)	>1 μM
CXCL8 (IL-8)	>1 μM
CXCL10 (IP10)	>1 μM
CXCL12 (SDF-1α)	>1 μM

Tabla 8. Ejemplos de inhibición de la quimoquina de la unión de CXCL13 humano biotinilado a Anticuerpo 1 IgG₁ alineado germinalmente (n=1 dato solamente)

El CXCL13 humano y el CXCL13 cinomólogo compitieron con el CXCL13 humano biotinilado para la unión al Anticuerpo 1 IgG₁ alineado germinalmente. Ninguna de las otras quimoquinas probadas mostró inhibición de la interacción de unión del Anticuerpo 1 IgG al CXCL13 humano biotinilado hasta una concentración de 1 μM.

Ejemplo 3a: Afinidad de los anticuerpos para el CXCL13 humano y cino

3.1 Determinación de la afinidad del anticuerpo por mediciones
BIAcore

La determinación de los parámetros de unión cinéticos fue hecha por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando el biosensor óptico BIAcore 2000 (BIAcore AB, Upsalla, Suecia) esencialmente como es descrito por Karlsson y otros, 1991. Ver también la sección Materiales y Métodos de Ensayo.

Orientación 1.

La química de enlace amina estándar fue empleada para crear patrones y superficies 265 RU de Proteína G' (Sigma P4689) en las celdas de flujo (Fc) 1 y 2, respectivamente, de un chip CM5 normalizado (BIAcore, BR-1000-14). Esta superficie de Proteína G' Fc 2 fue usada para capturar el Anticuerpo 1 240-385 RU (IgG₁ alineado germinalmente).

Celdas de flujo(Fc)	Ligando	Respuesta 1 (RU unido)
1	Patrón (HBS-EP)	n/a
2	Proteína G' (diluida a 20 µg mL ⁻¹ en 10 mM buffer de acetato pH 4.5)	265

Tabla 9.

Las diluciones de CXCL13 cinomólogo y humano (en buffer HBS-EP) fueron entonces fluidas sobre la superficie chip a una tasa de flujo de 100 µL min⁻¹.

1:1 Langmuir con modelo de limitación de transporte de masa se ajusta al dato Fc 2-1

Las condiciones de ajuste (realizadas en BIAevaluation 3.2): El doble patrón sustraído (el dato de la celda de flujo patrón sustraído del dato de la celda de flujo IgG y una inyección patrón (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactante P20, HBS-EP) fue sustraído del resto del conjunto de

datos). Las contribuciones RI en masa fueron todas establecidas en cero localmente.

Usando el modelo de limitación de transporte de masa de Langmuir 1:1, sustracción HBS-EP y RI establecido en cero, los siguientes parámetros fueron obtenidos, basado en las curvas de CXCL13 humano 0.25 - 20 nM (10 concentraciones).

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	Rmáx (RU)	K _D (M)	Chi ²
238 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente,	2.13 e7	6.84 e-4	37.2	3.22 e-11	0.425
385 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente,	1.42 e7	7.15 e-4	58.2	5.04 e-11	0.529
347 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente,	1.76 e7	7.36 e-4	52.9	4.17 e-11	0.690

Tabla 10a.

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	K _D (M)
Valores promedio de los 3 experimentos	1.77 e7	7.12 e-4	4.14 e-11

Tabla 10b.

Usando el modelo de limitación de transporte de masa de Langmuir 1:1, sustracción HBS-EP y RI establecido en cero; los siguientes

parámetros fueron obtenidos para el IgG, basado en las curvas de CXCL13 cino 0.125 - 40 nM (12 y 9 concentraciones).

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	Rmáx (RU)	K _D (M)	Chi ²
303 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente,	1.97 e7	6.50 e-4	49.6	3.30 e-11	1.35
296 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente,	2.05 e7	5.99 e-4	47.2	2.91 e-11	0.683

Tabla 11.

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	K _D (M)
Valores promedio de los 2 experimentos	2.01 e7	6.25 e-4	3.11 e-11

Tabla 11b.

El CXCL13 Cino ajustado para el Anticuerpo 1 (alineado germinalmente) da un valor K_D muy similar al CXCL13 humano sugiriendo que la afinidad para cada variante es muy similar.

[Orientación 2.

La química de enlace amina estándar fue empleada para crear superficies patrones (Fc 1) y 228 y 303 RU de estreptavidina (Perbio/Pierce 21125) en Celdas de flujo (Fc) 2 y 3, respectivamente, de un chip CM5 normalizado (BIAcore, BR-1000-14). Esta superficie de estreptavidina Fc 3 fue usada para

capturar 28 RU CXCL13 humano biotinilado próximo al terminal C (Almac custom Synthesis).

Las diluciones de los fragmentos Fab del Anticuerpo 1 monomerizados por Cromatografía de Exclusión de Tamaño (diluidos en buffer HBS-EP) fueron entonces fluidos sobre la superficie chip a una tasa de flujo de 30 $\mu\text{L min}^{-1}$.

1:1 Modelo de ajuste de Langmuir para el dato de Fc 3-1
Las condiciones de ajuste (realizadas en BIAevaluation 3.2): El doble patrón sustraído (dato de la celda de flujo patrón sustraído del dato de la celda de flujo IgG y una inyección patrón (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactante P20, HBS-EP) fue sustraído del resto del conjunto de de datos). Las contribuciones RI en masa fueron todas establecidas en cero localmente.

Usando el modelo de limitación de transporte de masa de Langmuir 1:1, sustracción HBS-EP y RI establecido en cero, los siguientes parámetros fueron obtenidos, basado en las curvas Fab del Anticuerpo 1 0.065 - 2.105 nM (IgG₁ alineado germinalmente) (6 concentraciones).

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	Rmáx (RU)	K _D (M)	Chi ²
28 RU CXCL13 humano	8.98 e6	1.66 e-3	41.6	1.85 e-10	0.394

Tabla 13

Ejemplo 3b: Afinidad de anticuerpos por el CXCL13 humano

Antes que un dato más comprehensivo se establezca en el Ejemplo 3a, el dato de afinidad inicial (n=1) se determinó usando una diseminación más baja de las concentraciones de CXCL-13 como es

descrito a continuación. Ver también la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

3.1b Determinación de la afinidad del anticuerpo por mediciones BIAcore

La determinación de los parámetros de unión cinéticos fue hecha por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando el biosensor óptico BIAcore 2000 (BIAcore AB, Upsalla, Suecia) esencialmente como es descrito por Karlsson y otros, 1991.

La química de enlace amina estándar fue empleada para crear superficies patrones (Fc 1) y 500 RU de Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente) diluidos en 10 mM buffer de acetato pH 4.5 en un chip CM3 (BIAcore, BR-1005-41).

Celda de flujo (Fc)	Ligando	Respuesta 1 (RU unido)	Destinado para (RU)
1	Patrón (HBS-EP)	n/a	-
2	Anticuerpo 1 (alineado germinalmente)	579.9	500

Tabla 14.

Las diluciones de CXCL13 cinomólogo y humano fueorn luego fluidas sobre la superficie chip.

Ajuste de Langmuir para los datos Fc 2-1 y 3-1
Las condiciones de ajuste (realizado en BIAevaluation 3.2):
El doble patrón sustraído (dato de la celda de flujo patrón sustraído del dato de la celda de flujo IgG y una inyección patrón (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactante P20, HBS-EP) fue sustraído del resto del conjunto de datos). La contribución RI en masa establecida en cero localmente.

Usando el modelo de Langmuir 1:1, sustracción HBS-EP y RI establecida en cero, los siguientes parámetros fueron obtenidos, basados en las curvas de CXCL13 humano 0.10 - 0.60 nM.

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	Rmáx (RU)	K _D (M)	Chi ²
579 RUs Anticuerpo 1 (alineado germinalmente)	2.02 e6	5.24 e-4	54.2	2.59 e-10	0.183

Tabla 15.

Usando el modelo de Langmuir 1:1, sustracción HBS-EP y RI establecida en cero, los siguientes parámetros fueron obtenidos para cada IgG, basados en las curvas de CXCL13 cino 0.10 - 0.60 nM.

	ka (M-1 s-1)	kd (s-1)	Rmáx (RU)	K _D (M)	Chi ²
579 RU Anticuerpo 1 (alineado germinalmente)	3.63 e6	1.04 e-4	38	2.85 e-10	0.161

Tabla 16.

Ejemplo 4: Inhibición de la quimiotaxia de las células B primarias inducida por CXCL13

4.1 Inhibición de la quimiotaxia de los linfocitos primarios aislados del bazo del ratón inducida por CXCL13

Los linfocitos primarios fueron aislados recientemente de bazos de ratones y cultivados toda la noche con LPS. Las células fueron luego usadas en un ensayo de quimiotaxia estimulada por CXCL13

murino comercialmente disponible (R&D Systems) o CXCL13 humano (derivado de células MEL). El dato IC₅₀ (nM) para el Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente) es mostrado en la Tabla 12 a continuación (n=1 y n=2 datos solamente).

IgG	IC ₅₀ (nM)	
	CXCL13 humano	CXCL13 Ratón
Anticuerpo 1 IgG (no alineado germinalmente)	29.76 (n=2) [27.3, n=1]	No medible

Tabla 12.

Ejemplo 5: Ensayo de quimiotaxia de células B de amígdalas humanas conducido por CXCL13

1.4 Inhibición de la quimiotaxia en células B de amígdalas humanas inducida por CXCL13

Células B de las amígdalas primarias fueron aisladas recientemente de amígdalas humanas y cultivadas toda la noche con LPS. Las células fueron luego usadas en un ensayo de quimiotaxia usando CXCL13 humano no glicosilatado (ABL - Derivado de células MEL) a una concentración ED80 (100nM). Para los detalles del método de ensayo, ver la sección "Materiales y Métodos de Ensayo". El dato IC₅₀ (nM) para el Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente) es mostrado en la Tabla 17 (n=4 dato).

IgG	Anticuerpo 1 (IgG ₁ alineado germinalmente)
IC ₅₀ (nM)	9.59 +/- 1.6

Tabla 17

Ejemplo 6: Unión del hCXCL13 Nativo al Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente) en un ELISA

Como es establecido en la sección "Materiales y Métodos de Ensayo", el Anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente) se une tanto al CXCL13 nativo y CXCL13 recombinante con concentraciones equivalente de ligandos que dan una señal equivalente en el ensayo.

Ejemplo 7: Perturbación de la tasa de intercambio H/D de CXCL-13 por el anticuerpo 1 (IgG₁ alineado germinalmente)

En el primer experimento CXCL13 fue intercambiado con D₂O en solución y luego unido al anticuerpo 1 (IgG1) inmobilizado en una columna. Este fue luego intercambiado otra vez en H₂O mientras estaba unido a la columna de anticuerpo, resultando que el epítipo es protegido durante la reacción de intercambio posterior y por consiguiente marcado con deuterones. En el segundo experimento el CXCL13 fue primero unido al anticuerpo 1 en la columna, luego marcado con D₂O y finalmente intercambiado otra vez en H₂O mientras estaba unido a la columna, de manera que ninguna parte del CXCL13 fuera marcada con deuterones. Las diferencias en masas de péptidos entre los dos experimentos fueron entonces determinadas. La diferencia en los niveles de deuteración entre los dos experimentos es una medida del retardo de intercambio cuando se une al anticuerpo. Un método detallado para este protocolo es proporcionado en la sección de Materiales y Métodos.

El CXCL13 humano expresado en células MEL fue usado en este estudio con la secuencia mostrada en SEQ ID NO 14.

La región que mostró la mayor perturbación en la tasa de intercambio de H/D fue entre los aminoácidos 31-42 de CXCL-13 humano (SEQ ID No. 20).

A pH 7 la tasa de intercambio es muy rápida a través de casi toda la molécula en ausencia de anticuerpo, lo que sugiere una estructura muy flexible. El intercambio fue disminuido a través del núcleo central de la molécula cuando estaba unida al

anticuerpo. Esto sugiere que existen probablemente otros sitios de interacción con unión más débil además a la principal de 31-42.

La Tabla 18 muestra la diferencia del porcentaje en los niveles de deuteración comparando la deuteración y el intercambio con los protones cuando se une al anticuerpo 1 con deuteración en solución e intercambio con protones cuando se une al anticuerpo. Las diferencias de más de 10% cuando se promedian los cuatro puntos de tiempo fueron consideradas significativas. La numeración del residuo es con la secuencia mostrada en SEQ ID NO. 14.

Residuo número		Punto de Tiempo (s)			
inicio	fin	150	500	1500	5000
3	5	4	3	-3	1
3	6	4	2	1	-1
6	9	4	-1	-5	-4
7	9	4	3	-2	-2
16	20	25	13	2	-5
21	24	5	6	11	6
21	28	6	16	25	20
23	28	11	18	27	19
31	42	29	28	19	14
33	42	31	30	31	16
45	53	24	11	15	6
45	54	24	15	11	6
56	61	11	21	30	24
57	61	10	23	31	22
63	65	24	12	-5	-4
64	67	30	11	-4	-3
68	69	48	23	2	-2
68	82	13	3	-5	-5
70	82	3	1	-5	-4
78	82	11	5	-5	-5

Tabla 18

Referencias

Todas las referencias citadas en cualquier parte en esta descripción, incluyendo aquellas citadas en cualquier parte anteriormente, son incorporadas aquí como referencia en su totalidad y para cualquier propósito.

- 1 Ansel, KM. y otros *Nature*, 406 : 309-314, 2000
- 2 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 3 Koide y otros (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- 4 Nygren y otros (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 5 Wess, L. In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004
- 6 Kabat, E.A. y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4^{ta} Edición. US Department of Health and Human Services. 1987
- 7 Martin, A.C.R. *Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25 (1996), 130-133
- 8 Kabat, E.A. y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington
- 9 Segal y otros, *PNAS*, 71:4298-4302, 1974
- 10 Amit y otros, *Science*, 233:747-753, 1986
- 11 Chothia y otros, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, 1987
- 12 Chothia y otros, *Nature*, 342:877-883, 1989
- 13 Caton y otros, *J. Immunol.*, 144:1965-1968, 1990
- 14 Sharon y otros, *PNAS*, 87:4814-4817, 1990
- 15 Sharon y otros, *J. Immunol.*, 144:4863-4869, 1990
- 16 Kabat y otros, *J. Immunol.*, 147:1709-1719, 1991
- 17 Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 2005
- 18 Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 19 Mendez, M. y otros (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
- 20 Knappik y otros *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 21 Krebs y otros *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84

- 22 Ward, E.S. y otros, Nature 341, 544-546 (1989)
- 23 McCafferty y otros (1990) Nature, 348, 552-554
- 24 Holt y otros (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490
- 25 Bird y otros, Science, 242, 423-426, 1988
- 26 Huston y otros, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988
- 27 Holliger, P. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993
- 28 Reiter, Y. y otros, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996
- 29 Hu, S. y otros, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996
- 30 Holliger y Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411-419
- 31 Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol 4, 446-449 1993
- 32 Glennie M J y otros, 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375
- 33 Repp R. y otros, 1995 J. Hemat. 377-382
- 34 Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 PNAS 83
- 35 Suresh M. R. y otros, 1986 Método Enzymol. 121: 210-228
- 36 Merchand y otros, 1998 Nature Biotech. 16:677-681
- 37 Ridgeway, J. B. B. y otros, Protein Eng., 9, 616-621, 1996
- 38 Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
- 39 Köhler y Milstein, Nature, 256:495-497, 1975
- 40 Wold, y otros. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
- 41 Norman y otros Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3^{ra} edición (April 1998) ISBN: 0471170828
- 42 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (Mayo 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 43 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (Diciembre 2000), ISBN: 0198507089

- 44 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Technics with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (Octubre 11, 1999), ISBN: 1558605525
- 45 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369
- 46 Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in drugs Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
- 47 Chothia C. y otros Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817
- 48 Al-Lazikani, y otros Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
- 49 Chothia, y otros Science, 223,755-758 (1986)
- 50 Whitelegg, N.R.u. y Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
- 51 Guex, N. y Peitsch, M.C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723
- 52 Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410
- 53 Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448
- 54 Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
- 55 Voet & Voet, *Biochemistry*, 2da Edición, (Wiley) 1995.
- 56 Gram y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580
- 57 Barbas y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813
- 58 Schier y otros, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567
- 59 Marks y otros *Bio/Technology*, 1992, 10:779-783
- 60 Kay, B.K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press
- 61 Hunter W. M. y Greenwood F. C. (1962) *Nature* 194:495.
- 62 Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)
- 63 Chadd HE y Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
- 64 Andersen DC y Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117

- 65 Larrick JW y Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418
- 66 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ra edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 67 Ausubel y otros eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4^{ta} edición 1999
- 68 Shi, K. y otros J. *Immunol*, 166 : 650-655, 2001
- 69 Manzo, A. y otros *Eur. J. Immunol*, 35 : 1347-1359, 2005
- 70 Kim, H-J. y otros J. *Immunol*, 162 : 3053-3062, 1999
- 71 Carlson, HS. y otros *Blood*, 104 : 3021-3027, 2004
- 72 Zheng, B. y otros *Arthritis & Rheumatism*, 52(2) : 620-626, 2005
- 73 Mazezetti, I. y otros *Arthritis & Rheumatism*, 50(1) : 112-122, 2004
- 74 Lisignoli, G. y otros J. *Cell. Physiol*, 206 : 78-85, 2006
- 75 Lisignoli, G. y otros *Experimental Gerontology*, 39 : 659-665, 2004
- 76 Bugatti, S. y otros *Arthritis & Rheumatism*, 52(11) : 3448-3459, 2005
- 77 Schaerli, P. y otros J. *Exp. Med*, 192(11) : 1553-1562, 2000
- 78 Breitfeld, D. y otros J. *Exp. Med*, 192(11) : 1545-1551, 2000
- 79 Yu, P. y otros J. *Immunol*, 168 : 5117-5123, 2002
- 80 Edwards, JCW. y otros *Rheum. Dis. Clin. N. Am*, 30 : 393-403, 2004
- 81 Edwards, JCW, Cambridge, G. *Nature. Rev. Immunol*, 6 : 394-403, 2006
- 82 Robinson, J. R. ed., *Sustained and Controlled Release Drugs Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
- 83 Ledermann J.A. y otros (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664
- 84 Bagshawe K.D. y otros (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922
- 85 Bannister D., Wilson A., Prowse L., Walsh M., Holgate R., Jermutus J. y Wilkinson T. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5): 931-937

- 86 Dietz L.J., Dubrow R.S., Manian B.S. y Sizto. N.L., Cytometry 23:177-186, 1996
- 87 Foote, J y Winter G. J. Mol. Biol. 224(2): 487-499, 1992
- 88 Karlsson R., Michaelsson A. y Mattsson L. J. Immunol. Methods, 145(102): 229-240, 1991
- 89 Hutchings, C. Generation of Naïve Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann y S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
- 90 Mach y otros Anal. Biochem. 200(1): 20-26, 1992
- 100 Mellentin-Michelotti J., Evangelista, L., Swartzman E.E., Miraglia, S.J., Werner W. y Yuan P.-M Anal. Biochem 272: 182-190, 1999
- 101 Miraglia S., Swartzman E.E., Mellentin-Michelotti J., Evangelista, L., Smith C., Gunawan I., Lohman K., Goldberg E.M., Manian B. y Yuan P.-M. J Biomol. Screening 4:193-204, 1999
- 102 Osbourn, JK. y otros Immunotechnology, 2(3):181-96, 1996
- 103 Persic, L. y otros Gene. 187(1): 9-18, 1997
- 104 Swartzman E.E., Miraglia S.J., Mellentin-Michelotti J., Evangelista L. y Yuan P-M. Anal. Biochem 271: 143-151, 1999
- 105 Tomlinson, I., VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido, 1997
- 106 Vaughan, TJ. y otros Nature Biotechnology 14(3):309-14, 1996
- 107 Zlotnik, A. y Yoshie, O. Immunity 12:121-7, 2000.

REIVINDICACIONES:

1. Un miembro de unión aislado para CXCL13, donde el miembro de unión inhibe la unión de CXCL13 al CXCR5, y donde el miembro de unión compite para la unión al CXCL13 con una molécula de anticuerpo scFv que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11.

2. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el miembro de unión comprende una secuencia de aminoácidos HCDR3 SEQ ID NO: 5.

3. Un miembro de unión aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende un conjunto de CDR del anticuerpo 1: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, definido donde:

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3;

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;

HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5;

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9; y

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10;

o que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1 con una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.

4. Un miembro de unión aislado para CXCL13, donde el miembro de unión inhibe la unión de CXCL13 al CXCR5 y donde el miembro de unión comprende un conjunto de CDR del anticuerpo 1: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, definido donde:

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3;

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;

HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5;

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9; y

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10;

o comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1 con una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.

5. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4 que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1 o que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1 con 1 ó 2 sustituciones.

6. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1.

7. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión comprende una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, donde la molécula de anticuerpo comprende un conjunto de CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, donde el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2, HCDR3 y un marco y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2, LCDR3 y un marco.

8. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 7, donde la molécula de anticuerpo es un scFv.

9. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 7, donde la molécula de anticuerpo comprende una región constante de anticuerpo.

10. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 9, donde la molécula de anticuerpo es un IgG1.

11. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la molécula de anticuerpo comprende regiones marco de secuencias de segmentos de gen de la línea germinal humana.

12. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el dominio VH de anticuerpo comprende el marco de la línea germinal humana VH3-23.
13. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde el dominio VH de anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 2.
14. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde la secuencia de aminoácidos del dominio VH de anticuerpo es SEQ ID NO: 2.
15. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde el dominio VL de anticuerpo comprende el marco de la línea germinal humana VK1 L12.
16. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de la secuencia con SEQ ID NO: 7.
17. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la secuencia de aminoácidos del dominio VL es SEQ ID NO: 7.
18. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la secuencia de aminoácidos del dominio VH de anticuerpo es SEQ ID NO: 2; y la secuencia de aminoácidos del dominio VL de anticuerpo es SEQ ID NO: 7.

19. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la potencia del miembro de unión para neutralizar la unión de CXCL13 humano al CXCR5 difiere en no más de 10 veces de la potencia del miembro de unión para neutralizar la unión de CXCL13 cinomólogo al CXCR5, donde

la potencia del miembro de unión para neutralizar la unión de CXCL13 humano al CXCR5 es representada por IC_{50} como se midió en un ensayo AMPc con una concentración de CXCL13 humano de no más de 2 nM, y donde

la potencia del miembro de unión para neutralizar la unión de CXCL13 cinomólogo al CXCR5 es representada por IC_{50} como se midió en un ensayo AMPc con una concentración final de CXCL13 cinomólogo de 2 nM.

20. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 19, donde la potencia para neutralizar la unión de CXCL13 humano al CXCR5 difiere en no más de 5 veces de la potencia para neutralizar la unión de CXCL13 cinomólogo al CXCR5.

21. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión tiene un IC_{50} de no más de 12nM como se midió en un ensayo AMPc CXCL13 humano con una concentración final de 2nM CXCL13.

22. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión tiene un IC_{50} de no más de 40nM como se midió en un ensayo de liberación de calcio estimulada por CXCL13 humano con una concentración final de 100nM CXCL13.

23. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión tiene un IC_{50} de no más de 12nM en un ensayo de quimiotaxia de células B estimulada por CXCL13 humano con una concentración final de CXCL13 humano que da aproximadamente una respuesta ED80, y una línea celular B no primaria.

155

24. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión se une al CXCL13 humano con una afinidad de menos de 400pM como se midió usando la resonancia de plasmón de superficie.

25. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión se une al CXCL13 cinomólogo con una afinidad de menos de 400pM como se midió usando la resonancia de plasmón de superficie.

26. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el miembro de unión se une a un epítipo de CXCL-13 humano y donde dicho epítipo incluye al menos un residuo de la secuencia Ile-Leu-Pro-Arg-Gly-Asn-Gly-Cys-Pro-Arg-Lys-Glu (SEQ ID NO: 20) en las posiciones 31-42 de IL-17A humana madura.

27. Un dominio VH aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 26.

28. Un dominio VL aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 26.

29. Una composición que comprende un miembro de unión aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30. Una composición que comprende un miembro de unión aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 30 para su uso en la inhibición de la unión de CXCL13 a CXCR5.

32. Uso de un miembro de unión aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para la fabricación de un medicamento para inhibir la unión de CXCL13 a CXCR5.
33. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 o el uso de acuerdo con la reivindicación 32, para su uso en la inhibición de la formación y/o desarrollo aberrante de folículos linfoides.
34. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 o el uso de acuerdo con la reivindicación 32, para su uso en la inhibición de la destrucción y/o remodelación de huesos y/o cartílagos.
35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 o el uso de acuerdo con la reivindicación 32, para su uso en la inhibición de la quimiotaxia de linfocitos y/o la proliferación de linfomas.
36. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 o el uso de acuerdo con la reivindicación 32, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de Sjogrens, esclerosis múltiple, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad autoinmune de las tiroides, Neuroborreliosis de Lyme, infección por VIH y/o leucemia.
37. Una composición de acuerdo con la reivindicación 31 o el uso de acuerdo con la reivindicación 32, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
38. Un método de tratamiento de un trastorno asociado con la expresión de CXCL13 y/o actividad de CXCL13 aberrante en un individuo, que comprende administrar un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 al individuo.
39. Un método de acuerdo con la reivindicación 38 donde la actividad de CXCL13 es la unión al CXCR5.

157

40. Un método de acuerdo con la reivindicación 39 que comprende inhibir la formación y/o desarrollo aberrante de los folículos linfoides en el individuo.

41. Un método de acuerdo con la reivindicación 39 que comprende inhibir la destrucción y/o remodelación de huesos y/o cartílagos en el individuo.

42. Un método de acuerdo con la reivindicación 39 que comprende inhibir la quimiotaxia de los linfocitos y/o proliferación de los linfomas en el individuo.

43. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39, donde el trastorno es la artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de Sjogrens, esclerosis múltiple, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad autoinmune de las tiroides, Neuroborreliosis de Lyme, infección por VIH y/o leucemia.

44. Un método de acuerdo con la reivindicación 43, donde el trastorno es la artritis reumatoide.

45. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un miembro de unión, o un dominio VH o VL aislado de un miembro de unión, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28.

46. Una célula hospedera transformada *in vitro* con ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45.

47. Un método de producir un miembro de unión o un dominio VH o VL de anticuerpo, que comprende cultivar células hospederas de acuerdo con la reivindicación 46 bajo condiciones para la producción del miembro de unión o dominio VH o VL de anticuerpo.

48. Un método de acuerdo con la reivindicación 47, que comprende además aislar y/o purificar el miembro de unión, dominio VH o dominio VL.

49. Un método de acuerdo con la reivindicación 47 o la reivindicación 48, que comprende además formular el miembro de unión, dominio VH o dominio VL en una composición que comprende al menos un componente adicional.

50. Un método para producir un dominio de unión antígeno anticuerpo para CXCL13, el método comprendiendo

proporcionar, por medio de la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH padre que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, donde el dominio VH padre HCDR1, HCDR2 y HCDR3 es un conjunto de HCDR del anticuerpo 1, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH padre, y opcionalmente combinar el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL para proporcionar una o más combinaciones VH/VL; y

probar dicho dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH padre o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un dominio de unión antígeno anticuerpo para CXCL13.

51. Un método de acuerdo con la reivindicación 50, donde el dominio VH padre es un dominio VH de acuerdo con la reivindicación 27.

52. Un método de acuerdo con la reivindicación 50 o la reivindicación 51 donde dicho uno o más dominios VL es proporcionado por medio de la adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VL padre que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, donde el dominio VL padre LCDR1, LCDR2 y LCDR3 es un conjunto VL de CDR del anticuerpo 1, que producen uno o más dominios VL cada uno de ellos es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VL padre.

53. Un método de acuerdo con la reivindicación 52 donde el dominio VL padre es un dominio VL de acuerdo con la reivindicación 28.

54. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, donde dicho dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH padre es proporcionado por mutagénesis CDR.

55. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53 que comprende además producir el dominio de unión antígeno anticuerpo como un componente de una molécula de anticuerpo IgG, scFv o Fab.

56. Un método para producir un miembro de unión que se une a CXCL13, dicho método comprende:

proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica un dominio VH o un repertorio de ácidos nucleicos de partida cada uno codificando un dominio VH, donde el dominio VH o dominios VH comprenden un HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 a ser remplazado o carecen de una región que codifica HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3;

combinar dicho ácido nucleico de partida o repertorio de partida con un ácido nucleico donante o ácidos nucleicos donantes que codifican o producidos por mutación de la secuencia de aminoácidos de un HCDR1, HCDR2, y/o HCDR3 del anticuerpo 1, de manera que dicho ácido nucleico donante es o los ácidos nucleicos donantes son insertados en la región CDR1, CDR2 y/o CDR3 en el ácido nucleico de partida o repertorio de partida, para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican los dominios VH;

expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos para producir dominios VH como productos;

opcionalmente combinar dichos dominios VH como productos con uno o más dominios VL;

seleccionar un miembro de unión para CXCL13, cuyo miembro de unión comprende un dominio VH como producto y opcionalmente un dominio VL; y

recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico que lo codifica.

57. Un método de acuerdo con la reivindicación 56 donde los ácidos nucleicos donantes son producidos por mutación de dicho HCDR1 y/o HCDR2.

58. Un método de acuerdo con la reivindicación 56 donde el ácido nucleico donante es producido por mutación de HCDR3.

59. Un método de acuerdo con la reivindicación 56, que comprende proporcionar el ácido nucleico donante por mutación aleatoria del ácido nucleico.

60. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56 a 59, que comprende además unir al dominio VH como producto que está comprendido dentro del miembro de unión recuperado a una región constante de anticuerpo.

161

61. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56 a 60 que comprende proporcionar una molécula de anticuerpo IgG, scFv o Fab que comprende el dominio VH como producto y un dominio VL.

62. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 61, que comprende además probar el dominio de unión antígeno anticuerpo o el miembro de unión que se une a CXCL13 para la capacidad de neutralizar el CXCL13.

63. Un método de acuerdo con la reivindicación 62, donde un miembro de unión que comprende una molécula de anticuerpo que se une y neutraliza CXCL13 es obtenido.

64. Un método de acuerdo con la reivindicación 63, donde la molécula de anticuerpo es un scFv.

65. Un método de acuerdo con la reivindicación 63, donde la molécula de anticuerpo es un IgG.

66. Un método para producir una composición de la molécula de anticuerpo, que comprende obtener una molécula de anticuerpo que usa un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 50 a 65, y formular la molécula de anticuerpo en una composición que comprende al menos un componente adicional.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Barker, Wendy
Keyes, Feenagh
AstaZeneca AB
MedImmune Limited

<120> Compuestos

<130> 102532

<150> US60/890,888

<151> 2007-02-21

<150> US60/908,041

<151> 2007-03-26

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 1

gaggtgcagc tgctggagtc tgggggaggc ttggtgcagc cagggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttggt aattcttgga tgagttgggt ccgccaggct
120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaataa acagcctgcg agctgaggac acggctgtgt attactgtac gagagatctt
300

ccgggtatag cagtggctgg ttactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcgagt
357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 2

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Leu Pro Gly Ile Ala Val Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 3

Asn Ser Trp Met Ser
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 4

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 5

Asp	Leu	Pro	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Gly	Tyr
1				5					10

<210> 6

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpol

<400> 6

gacacccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc
60

atcacctgcc gggccagtga gggatattat cactgggttg cctggtatca gcagaagcca
120

gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcctctagtt tagccagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct
240

gatgatattg caacttatta ctgccaacaa tatagtaatt atccgctcac ttccggcgga
300

gggaccaagc tggagatcaa acgt
324

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Anticuerpol

<400> 7

Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Anticuerpol

<400> 8

Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Anticuerpo1

<400> 9

Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Anticuerpo1

<400> 10

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos scFv Anticuerpo 1 (VH seguido por
VL con secuencia enlazadora)

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Ser
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Leu Pro Gly Ile Ala Val Ala Gly Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
130 135 140

Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
165 170 175

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
210 215 220

Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys Arg

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CXCL13 humano de longitud completa

<400> 12

Met Lys Phe Ile Ser Thr Ser Leu Leu Leu Met Leu Leu Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Ser Pro Val Gln Gly Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg
20 25 30

Cys Arg Cys Val Gln Glu Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile
35 40 45

Asp Arg Ile Gln Ile Leu Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu
50 55 60

Ile Ile Val Trp Lys Lys Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln
65 70 75 80

Ala Glu Trp Ile Gln Arg Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Leu Pro Val Pro Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro
100 105

<210> 13

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CXCL13 humano maduro

<400> 13

Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Leu
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys
35 40 45

Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg
50 55 60

Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser Ser Thr Leu Pro Val Pro
65 70 75 80

Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro
85

<210> 14
<211> 82
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CXCL13 humano maduro con
truncación del terminal C

<400> 14

Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Leu
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys
35 40 45

Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg
50 55 60

Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser Ser Thr Leu Pro Val Pro
65 70 75 80

Val Phe

<210> 15
<211> 87
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CXCL13 cinomólogo maduro

17C



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-07-09

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ASTRAZENECA AB Y MEDIMMUNE LIMITED**

(72) Inventor(es): BARKER, Wendy y KEYES, Feenagh, Anne.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/890,888	21-02-07	US
	60/908,041	26-03-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-09-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **28-08-08**

Fecha de presentación de la solicitud: 20-02-08

N° publicación: **WO 2008/102123 A1**

No. de solicitud: **PCT/GB2008/000567**

(54) Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-07-09

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ASTRAZENECA AB Y MEDIMMUNE LIMITED**

(72) Inventor(es): BARKER, Wendy y KEYES, Feenagh, Anne.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/890,888	21-02-07	US
	60/908,041	26-03-07	US

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 21-09-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 20-02-08
No. de solicitud: **PCT/GB2008/000567**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **28-08-08**

No. Publicación : **WO 2008/102123 A1**

(54) Título:

· ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Un miembro de unión aislado para CXCL13, donde el miembro de unión inhibe la unión de CXCL13 al CXCR5, y donde el miembro de unión compete para la unión al CXCL13 con una molécula de anticuerpo scFv que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11.

AD

<400> 15

Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr His Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Ser
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys
35 40 45

Asn Lys Ser Val Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg
50 55 60

Ile Met Glu Met Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ser Thr Pro Pro Val Pro
65 70 75 80

Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro
85

<210> 16

<211> 82

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CXCL13 cinomólogo maduro con
truncación del terminal C

<400> 16

Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr His Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Ser
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys
35 40 45

Asn Lys Ser Val Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg
50 55 60

Ile Met Glu Met Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ser Thr Pro Pro Val Pro

171

65

70

75

80

Val Phe

<210> 17

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 del CXCR5 humano

<400> 17

Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu Asp
1 5 10 15

Leu Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr Ser Leu
20 25 30

Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu Met Ala Ser
35 40 45

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

Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu Arg His Arg
65 70 75 80

Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala
85 90 95

Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser
100 105 110

Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu
115 120 125

His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala
130 135 140

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His

145 150 155 160

Arg Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val
 165 170 175

Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln
 180 185 190

Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn
 195 200 205

Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val
 210 215 220

Ala Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly
225 230 235 240

Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln Lys
 245 250 255

Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu Cys Trp
 260 265 270

Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala Arg Leu Lys
 275 280 285

Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro Val Ala Ile
290 295 300

Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu Asn Pro Met
305 310 315 320

Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu Ser Arg Leu
 325 330 335

Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe
 340 345 350

Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser
 355 360 365

Leu Thr Thr Phe
370

<210> 18
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 del CXCR5 humano

<400> 18

Met Ala Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile
1 5 10 15

Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu
20 25 30

Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu Phe His Leu
35 40 45

Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro Phe Ala Val Ala
50 55 60

Glu Gly Ser Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe Leu Cys Lys Thr Val
65 70 75 80

Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys Ser Ser Leu Leu Leu Ala
85 90 95

Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val His Ala
100 105 110

Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu Ser Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile
115 120 125

Trp Leu Val Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys
130 135 140

Val Ser Gln Gly His His Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser
145 150 155 160

Gln Glu Asn Gln Ala Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu
165 170 175

Tyr His Val Ala Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys
180 185 190

Tyr Val Gly Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln
195 200 205

Arg Gln Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe
210 215 220

Leu Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala
225 230 235 240

Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu Pro
245 250 255

Val Ala Ile Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys Cys Leu
260 265 270

Asn Pro Met Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg Ser Asp Leu
275 280 285

Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro Ala Ser Leu Cys
290 295 300

Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asn
305 310 315 320

Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe
325

<210> 19
<211> 353
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos Gqi5 de la proteína G

<400> 19

Met Ala Cys Cys Leu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Ala Arg Arg Ile Asn
1 5 10 15

Asp Glu Ile Glu Arg Gln Leu Arg Arg Asp Lys Arg Asp Ala Arg Arg
20 25 30

Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu Gly Thr Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr
35 40 45

Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Ser Gly Tyr Ser Asp Glu
50 55 60

Asp Lys Arg Gly Phe Thr Lys Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Thr Ala
65 70 75 80

Met Gln Ala Met Ile Arg Ala Met Asp Thr Leu Lys Ile Pro Tyr Lys
85 90 95

Tyr Glu His Asn Lys Ala His Ala Gln Leu Val Arg Glu Val Asp Val
100 105 110

Glu Lys Val Ser Ala Phe Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Ile Lys Ser
115 120 125

Leu Trp Asn Asp Pro Gly Ile Gln Glu Cys Tyr Asp Arg Arg Arg Glu
130 135 140

Tyr Gln Leu Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu Asp Arg
145 150 155 160

Val Ala Asp Pro Ser Tyr Leu Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu Arg Val
165 170 175

Arg Val Pro Thr Thr Gly Ile Ile Glu Tyr Pro Phe Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Val Ile Phe Arg Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg
195 200 205

Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asn Val Thr Ser Ile Met Phe Leu Val
210 215 220

176

Ala Leu Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Val Glu Ser Asp Asn Glu Asn
225 230 235 240

Arg Met Glu Glu Ser Lys Ala Leu Phe Arg Thr Ile Ile Thr Tyr Pro
245 250 255

Trp Phe Gln Asn Ser Ser Val Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Glu Lys Ile Met Tyr Ser His Leu Val Asp Tyr Phe Pro Glu
275 280 285

Tyr Asp Gly Pro Gln Arg Asp Ala Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Leu
290 295 300

Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser
305 310 315 320

His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala
325 330 335

Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Asp Gly Gly Leu
340 345 350

Phe

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Péptido CXCL-13 humano
<400> 20

Ile Leu Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu
1 5 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-078979- -00001-0000

Fecha: 2009-08-25 16:19:47 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 329 CTOINFORMACION Folios: 9

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941
APARTADO AEREO 12304
TEL: 57-1-3264270 57-1-6069700
FAX: 57-1-3264271 57-1-6069701
CABLES: LLOREDA
CALLE 72 No. 5-83 5º. PISO
www.lloredacamacho.com
jlcco@lloredacamacho.com

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: PI.-ASTRAZENECA AB Y MEDIMMUNE LIMITED.-Solicitud de
Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "ANTICUERPOS
MONOCLONALES ANTI-CXCL13".-Clase C07K 16/24.-Expediente
número 09-078.979.-

1. Me refiero a mi Solicitud de Patente de Invención de 29 de Julio de 2009.
2. Atentamente me permito presentar a ese Despacho los documentos que acreditan el traspaso, que los autores de la patente de la referencia hacen a favor de mi representado, de los derechos sobre la misma, debidamente apostillados, junto con las Traducciones Oficiales números 2009-08-03-448 y 2009-08-18-485, legalizadas hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo los números 017885 y 017886 de 5 de Agosto de 2009 y 021424 de 21 de Agosto de 2009, respectivamente.
3. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-08-03-448
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS

SEPASE que yo, ADRIAN PETER MARK WATNEY de 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, Reino Unido, un Notario Público, debidamente autorizado

CERTIFICO ÚNICAMENTE que Blair Consular Services Limited en nombre de sus clientes

ASRAZENECA AB y MEDIMMUNE LIMITED

me ha presentado este día el documento adjunto al presente

TRASPASO firmado por Wendy Barker

y que Blair Consular Services Limited ha declarado ante mí que sus clientes les han informado a ellos que dicho documento adjunto es un documento original genuino.

FIRMADO Y SELLADO en 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, Reino Unido, el 9 de julio de 2009.

(firma: ilegible)

Adrian Peter Mark Watney

Sello Notarial

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 AGO -5 A 11:41

017885

CLPZ - LEGALIZACIONES³
LOBOTA D.C.

CUYA FIRMA APARECE EN EL
EL DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado por A P M Watney
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario

Certificado

- | | |
|--|--|
| 5. en Londres | 6. el día 13 de julio de 2009 |
| 7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth | |
| 8. No. I208527 | |
| 9. Sello/Estampilla
Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth | 10. Firma: (ilegible)
E Wolstenholme
Por el Secretario de Estado |

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 AGO -5 A 11: 41

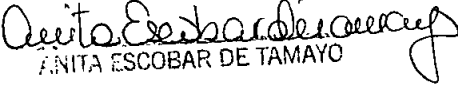
017886

LEGACIONES
L. 9974 D.C.

ANITA ESCOBAR
CITA FIGURA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUENTES INDICADAS

Traspaso de la invención llamada ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13, documento escrito en inglés y en español.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 3 de agosto de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

BE IT KNOWN that I, ADRIAN PETER MARK WATNEY of 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, United Kingdom, a duly authorised Notary Public

CERTIFY ONLY that Blair Consular Services Limited on behalf of their clients

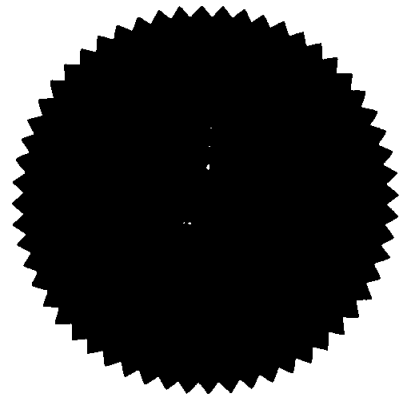
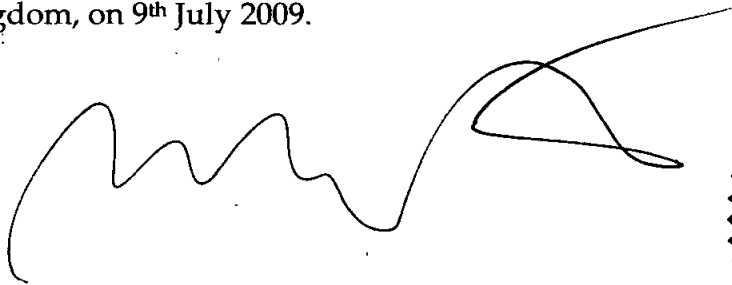
ASTRAZENECA AB and MEDIMMUNE LIMITED

have this day presented to me the hereto annexed document

ASSIGNMENT signed by Wendy Barker

and that the said Blair Consular Services Limited have represented to me by such presentation that their said clients have represented to them that the said annexed document is a authentic original document.

SIGNED AND SEALED at 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, United Kingdom, on 9th July 2009.



Adrian Peter Mark Watney
Notary Public

9

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

- 1 Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **A P M Watney**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
- Certified/Attesté
6 the/le **13 July 2009**
- 7 by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

- 8 Number/sous No **I208527**

9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **E Wolstenholme**
EW



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

INVENT

I, the undersigned,

BARKER Wendy

domiciled in
C/o AstraZeneca R&D Alderley, AstraZeneca
Intellectual Property, Alderley Park, Macclesfield,
Cheshire, SK10 4TG, United Kingdom
Together with
KEYES Feenagh, Anne of MedImmune Limited,
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, United Kingdom

hereby state under oath to be the sole and true inventor
of

MONOCLONAL ANTI-CXCL13 ANTIBODIES

state as well that assign, without reservations or
limitation, in favor of

AstraZeneca AB and MedImmune Limited

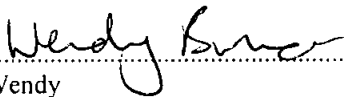
corporations organized and existing under the laws of

Sweden and the United Kingdom

domiciled in

SE-151 85 Södertälje, Sweden and
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, United Kingdom

all rights inherent to said invention, and that the above
mentioned corporation hereby is enabled to apply, in its
name, for the corresponding patent in the Republic of
Colombia.



BARKER Wendy

TRASPASO

abajo firmado

BARKER Wendy

domiciliado en
C/o AstraZeneca R&D Alderley, AstraZeneca
Intellectual Property, Alderley Park, Macclesfield,
Cheshire, SK10 4TG, Reino Unido
Junto con
KEYES Feenagh, Anne de MedImmune Limited,
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, Reino Unido

decla bajo juramento ser único y verdadero inventor
de.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13

Declaro asimismo que cedo y transfiero sin
reserva ni limitación, a favor de la sociedad

AstraZeneca AB y MedImmune Limited

organizada y existente de conformidad con la leyes de

Suecia y el Reino Unido

domiciliada en

SE-151 85 Södertälje, Suecia y
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, Reino Unido

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la
citada sociedad queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en la República de
Colombia.

**CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)**

A los días del mes de
, comparecí personalmente ante mí,
Notario Publico,

a quien doy fé de conocer y me consta que
la persona descrita y firmante
del documento que precede, declarado ante mí que
otorga el mismo para los fines y propósitos que
en él se expresan.

NOTARY PUBLIC (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
personally appeared before me, a Notary Public,

to me known and known to me to be the person
described in and who executed the foregoing document,
and duly acknowledged to me that
 executed the same for the uses and purposes
therein expressed.

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los días del mes de
, comparecí personalmente ante mí,
Notario Publico,

a quien doy fé de conocer y me consta que
la persona descrita y firmante
del documento que precede, declarado ante mí que
otorga el mismo para los fines y propósitos que
en él se expresan.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this day of
personally appeared before me, a Notary Public,

to me known and known to me to be the person
described in and who executed the foregoing document,
and duly acknowledged to me that
 executed the same for the uses and purposes
therein expressed.

183

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-08-18-485
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Traspaso de la invención llamada "ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL 13",
documento escrito en inglés y en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado por D J Jackson

3. actuando como Notario Público

4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario

Certificado

5. en Londres

6. el día 06 de julio de 2009

7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y
del Commonwealth

8. No. **I200330**

9. Sello/Estampilla

10. Firma: (ilegible)

Sello de la Oficina de Asuntos

R. Bawden

Exteriores y del Commonwealth

Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 18 de agosto de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO 21 A 9:51

LEGALIZACIONES
LOSOTA D.C.

BOGOTÁ D.C.
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

021424

DNITA ESCOBAR
CUYA FIRMA APARECE EN EL
ST. DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

ASSIGNMENT

The undersigned,

KEYES Feenagh, Anne

domiciled in

MedImmune Limited, Milstein Building, Granta Park,
Cambridge, Cambridgeshire, CB21 6GH, United
Kingdom

Together with

BARKER Wendy C/o AstraZeneca R&D Alderley,
AstraZeneca Intellectual Property, Alderley Park,
Macclesfield, Cheshire, SK10 4TG, United Kingdom

hereby state under oath to be the sole and true inventor
of

MONOCLONAL ANTI-CXCL13 ANTIBODIES

state as well that assign, without reservations or
limitation, in favor of

AstraZeneca AB and MedImmune Limited

corporations organized and existing under the laws of

Sweden and the United Kingdom

domiciled in

SE-151 85 Södertälje, Sweden and
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, United Kingdom

all rights inherent to said invention, and that the above
mentioned corporation hereby is enabled to apply, in its
name, for the corresponding patent in the Republic of
Colombia.

TRASPASO

abajo firmado

KEYES FEENAGH, ANNE

domiciliado en

MedImmune Limited, Milstein Building, Granta
Park, Cambridge, Cambridgeshire, CB21 6GH, Reino
Unido

Junto con

BARKER Wendy C/o AstraZeneca R&D Alderley, AstraZeneca
Intellectual Property, Alderley Park, Macclesfield,
Cheshire, SK10 4TG, Reino Unido

decla bajo juramento ser único y verdadero inventor
de.

ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CXCL13

Declaro asimismo que ced y transf sin
reserva ni limitación, a favor de la sociedad

AstraZeneca AB y MedImmune Limited

organizada y existente de conformidad con la leyes de

Suecia y el Reino Unido

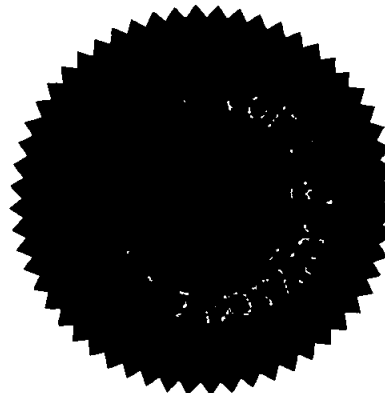
domiciliada en

SE-151 85 Södertälje, Suecia y
Milstein Building, Granta Park, Cambridge,
Cambridgeshire, CB21 6GH, Reino Unido

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la
citada sociedad queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en la República de
Colombia.

KEYES Feenagh, Anne

5 Jan 2009



REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

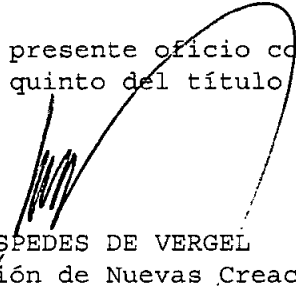
REFERENCIA	Radicación No.	9 78979
	Solicitud internacional	PCT/GB2008/000567
	Fecha inicio fase nacional	21/09/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11576

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior, requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 16 OCT. 2009
jfernand

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

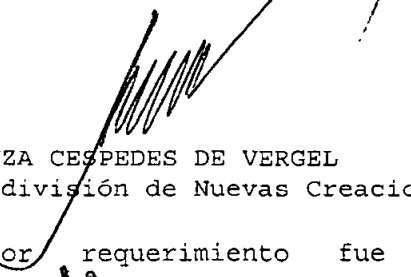
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ASTRAZENECA AB
MEDIMMUNE LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	9 78979
	Solicitud internacional	PCT/GB2008/000567
	Fecha inicio fase nacional	21/09/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11577

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 16 OCT. 2009
jfernand