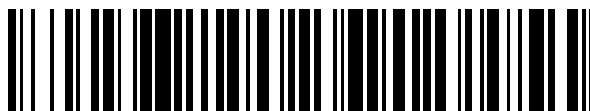


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 156 581**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99916365 .2**  
96 Fecha de presentación: **29.03.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1068357**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **APLICACIONES TERAPÉUTICAS Y DIAGNÓSTICAS BASADAS EN LA FUNCIÓN DEL GEN CXCR-4 EN LA TUMORIGÉNESIS.**

30 Prioridad:  
**30.03.1998 US 79916 P**  
**16.10.1998 US 104656 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.02.2012**

73 Titular/es:  
**NorthWest Biotherapeutics, Inc.**  
**4800 Montgomery Lane, Suite 800**  
**Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:  
**MURPHY, Gerald, P.;**  
**BOYNTON, Alton, L. y**  
**SEHGAL, Anil**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 156 581 T3

## DESCRIPCIÓN

Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas basadas en la función del gen CXCR-4 en la tumorigénesis.

### 1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación de una nueva función del gen CXCR-4 en la tumorigénesis, en particular, en la tumorigénesis primaria cerebral, mamaria y colorectal. La presente invención se refiere a la función de los ácidos nucleicos y polipéptidos de CXCR-4 como herramienta de diagnóstico para indicar un estado precanceroso o canceroso, y a agentes terapéuticos basados en los mismos para inhibir la expresión y/o actividad génicas de CXCR-4 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la tumorigénesis.

### 2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

#### 2.1. TUMORES CEREBRALES

Los tumores cerebrales figuran entre las principales causas de muerte entre niños pequeños y adultos. En un estudio realizado por la Sociedad Americana del Cáncer quedó documentado que en 1995 murieron 13.300 personas afectadas por tumores cerebrales y predijo que en 1996 morirían más de 17.900 (Parker et al., 1996, CA Cancer J. Clin., 46:5-28). El número de muertes causadas por tumores cerebrales ha aumentado a un ritmo significativo año a año. Cada año, se diagnostican una media de 25.000 americanos con cáncer cerebral. Los tumores cerebrales se cobran la vida de más niños que cualquier otro tipo de cáncer, excepto la leucemia.

El aumento de la incidencia de tumores cerebrales no sólo es evidente en niños, sino también en adultos. Se ha documentado que entre 1982 y 1996 se ha producido un aumento significativo de la mortalidad como consecuencia de tumores primarios malignos en adultos (Parker et al., 1996, CA Cancer J. Clin., 46:5-28). Los glioblastomas, astrocitomas y meningiomas son los tipos de tumores cerebrales más corrientes que afectan a los adultos (Thapar y Laws, 1993, CA Cancer J. Clin., 43:263-271).

La transformación de las células cerebrales humanas normales en gliomas se produce como resultado de la acumulación de una serie de cambios celulares y genéticos (Sehgal, 1998 Cancer Surv., 25:233-275; von Diemling et al., 1995 Glia 15:328-338; Furnari et al., 1995, J. Surg. Oncol. 67:234). Estas alteraciones genéticas incluyen la pérdida, ganancia o amplificación de diferentes cromosomas. Estos cambios genéticos llevan a una expresión alterada de las proteínas que desempeñan funciones importantes en la regulación de la proliferación normal de células. Se han observado varias alteraciones genéticas comunes a nivel cromosómico (pérdida de 17p, 13q, 9p, 19, 10, 22q, 18q y amplificación de 7 y 12q) (Sehgal et al., 1998, J. Surg. Oncol. 67:23; von Diemling et al., 1995, Glia 15:328-338; Furnari et al., 1995, Cancer Surv. 25:233-275). Estas alteraciones desembocan en cambios en la expresión de varios genes (p53, RB, INF $\alpha$ / $\beta$ , CDKN2, MMAC1, DCC, EGFR, PDGF, PDGFR, MDM2, GLI, CDK4 y SAS) durante la génesis y progresión de gliomas humanos (Sehgal, 1998, J. Surg. Oncol. 67:234; vonDiemling et al., 1995, Glia 15:328-338). Estudios recientes han sugerido que la expresión alterada de otros muchos genes (MET, MYC, TGF $\beta$ , CD44, VEGF, NCAML1, p21waf1/Cipl, trkA, MMRs, C4-2, D2-2) y proteínas (catepsinas, tenascinas, metaloproteasas de matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas, sintetasas de óxido nítrico, integrinas, receptores de IL 13, conexinas 43, proteínas de la matriz extracelular del uPAR y proteínas de choque térmico) está asociada a la génesis de gliomas humanos (Sehgal, 1998, J. Surg. Oncol. 67:234). En conjunto, estos hallazgos señalan el hecho de que la acumulación de múltiples mutaciones genéticas, junto con importantes cambios en la expresión génica, pueden ser un requisito previo a la etiología de los gliomas humanos. A pesar de la identificación de estas alteraciones genéticas, la serie exacta de eventos que conduce a la génesis de los gliomas humanos no está clara.

Los glioblastomas multiformes son astrocitomas de alto grado que crecen muy rápidamente y contienen células muy malignas (Thapar y Laws, 1993, CA Cancer J. Clin., 43:263-271). En la base molecular de la ocurrencia de glioblastomas multiformes pueden verse involucrados eventos sistemáticos a nivel cromosómico o a un nivel de expresión génica. Estos pueden incluir la inactivación de genes supresores de tumores, la activación de oncogenes o translocaciones específicas a nivel cromosómico. Algunos cambios genéticos a nivel cromosómico y a nivel de expresión génica han quedado bien documentados en el caso de otros tumores cerebrales (Furnari et al., 1995, Cancer Surv., 25:233-275). Por ejemplo, se ha documentado que la pérdida de genes supresor(es) de tumores en el cromosoma 10, las mutaciones en el p53 o la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico, pueden ser eventos importantes ligados al desarrollo de glioblastomas multiformes. Otros muchos genes como el EGFR, CD44, (34 integrinas, metaloproteinasas de tipo membrana (MT-MMP), p21, pl6, pl5, myc, y VEGF han demostrado estar sobreexpresados en distintos tipos de tumores cerebrales (Faillot et al., 1996, Neurosurgery, 39:478-483; Eibl et al., 1995, J. of Neurooncol., 26:165-170; Previtali et al., 1996, Neuropathol. Exp. Neurol. 55:456-465; Yamamoto et al., 1996, Cancer Res., 56:384-392; Jung et al., 1995, Oncogene, 11:2021-2028; Tsuzuki et al., 1996, Cancer, 78:287-293; Chen et al., 1995, Nature Med., 1:638-643; Takano, et al., 1996, Cancer Res., 56.: 2185-2190; Bogler et al. , 1995, Glia, 15.: 3 08-327). Otros genes, como el p53, presentan mutaciones en la mayoría de los tumores cerebrales (Bogler et al., más arriba). No se sabe cómo la interacción de uno o más de estos genes conduce a la tumorigénesis pero es probable que para que se dé una transformación neoplásica se necesiten

múltiples pasos. La serie exacta de eventos que conducen a la iniciación o progresión de los glioblastomas no se conoce de momento y faltan marcadores útiles para la detección precoz de los tumores cerebrales.

## 2.2. CXCR-4

Los receptores de quimiocinas desempeñan una función importante en la quimiotaxis de células T y células fagocíticas hacia las áreas de inflamación. Al CXCR-4 se le identificó en un primer momento como un ADNc que fue amplificado utilizando cebadores redundantes desarrollados contra los receptores de los factores quimiotácticos de leucocitos (péptidos N-formilo, C5a e IL-8) y se le denominó HM89 (Endres et al., 1996, Cell 87:745). Tras un análisis de unión de ligandos quedó demostrado que el HM89 no era un receptor de péptidos N-formilo, pero en un análisis de secuencias quedó claramente demostrado que es un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G. El análisis citogenético indica que el HM89 está localizado en el cromosoma humano 2q21 (Benl et al., 1996, Nature 382:829). Al HM89 se le reclonó más tarde utilizando un ADNc del receptor de IL-8 de conejos tras el cribado de una librería de monocitos humanos y se le denominó LESTR (receptor con siete dominios transmembrana derivado de leucocitos (Nagasawa et al. 1996, Nature 382:635); y se le volvió a clonar e identificar como cofactor para la fusión del VIH-1 y la entrada en células CD4+ (De Risi et al., 1996, Nature, Genetics 14:457). Este cofactor fue idéntico al HM89 previamente clonado, y en virtud de su función como proteína de fusión entre el virus VIH-1 y las células CD4+ se le denominó "fusina". La fusina junto con la CD4 es suficiente para permitir la entrada del VIH-1 en células no permisivas de murino 3T3 (De Risi et al., 1996, Nature, Genetics 14:457). El análisis de las secuencias indicó que el HM89, el LESTR y la fusina son todos el mismo gen y, dadas sus propiedades de quimioatracción, a estos genes se les denomina hoy día receptor de quimiocinas CXCR-4 (CXCR-4). Recientemente ha quedado demostrado que la infección por VIH-1 independiente de la CD4 fue mediada por el receptor CXCR-4 (Feng et al., 1996, Science 172:872). Al ligando de CXCR-4 se le clonó recientemente y se le denominó PBSF/SDF-1 (factor de estimulación del crecimiento de células pre-B/factor 1 derivado de células estromales) (Engelhard et al., 1997, Neurosurgery 41:886). Los ratones transgénicos a los que les faltaba el PBSF/SDF-1 murieron en la fase prenatal y el número de sus progenitores de células B y mieloides se había visto seriamente reducido (Harihabu et al., 1997 J. Biol. Chem. 272:28726). Este resultado demuestra claramente que el PBSF/SDF-1 es el responsable de la linfosis en las células B y la mielopoyesis en la médula ósea.

Estudios recientes demuestran que el CXCR-4 actúa como correceptor junto con la CD4 para la entrada de cepas tropicas de células T de VIH en células diana (Nomura et al., 1993, Int. Immunol. 5:1239; Federspiel et al., 1993, Genomics 16:707). El mecanismo por el cual el VIH-1 interactúa con el receptor de quimiocinas CXCR-4 y las moléculas CD4 durante la infección no está claro. También quedó demostrado que la infección por VIH-2 de las células CD4 puede ocurrir rápidamente utilizando el receptor CXCR-4 del cofactor del VIH-1 (Loetscher et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:232). La interacción y los efectos citopáticos causados por la entrada del VIH-2 en las células CD4 quedaron inhibidos a través de un anticuerpo monoclonal frente a la proteína CXCR-4 (Doranz et al., 1997, Immunol. Resh. 16:15) (Feng et al., 1996, Science 272:872). La función de CXCR-4 en la infección por VIH quedó aún más patente cuando su introducción en células CD4 humanas y no humanas permitió la infección por VIH-2 (Doranz et al., 1997, Immunol. Res. 16:15) (Feng et al., 1996, Science 272:872).

La mención de las referencias que aquí se hacen no debe interpretarse como una admisión de que tales referencias son técnicas anteriores respecto a la presente invención.

## 3. BREVE EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

La presente invención, tal y como queda definida en las reivindicaciones, se refiere al descubrimiento de una nueva función de CXCR-4 en el comportamiento proliferativo aberrante de una serie de tipos celulares, incluidos numerosos tumores primarios y líneas celulares derivadas. En concreto, la presente invención se refiere a la identificación de la función de CXCR-4 en la transformación celular y la tumorigénesis, en particular, tumores cerebrales, mamarios y colorrectales. La presente invención también se refiere a una molécula que inhibe la función de CXCR-4 según las reivindicaciones, para el tratamiento o prevención de la tumorigénesis. La presente descripción también se refiere a aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico basadas en un ligando CXCR-4, el SDF-1, y proteínas, ácidos nucleicos, y agonistas y antagonistas del SDF-1, para el tratamiento o prevención de la tumorigénesis. La presente descripción también se refiere a ensayos de cribado para identificar moduladores de la actividad y/o expresión de CXCR-4 como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento y/o prevención de un fenotipo transformado o tumorigénesis.

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de los Solicitantes de que la secuencia de nucleótidos CXCR-4 y el producto génico codificado se expresa en altos niveles en el tejido del glioblastoma multiforme, además de en otras formas de tumores y cánceres.

En una realización, la presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos complementarias a la secuencia de nucleótidos CXCR-4, tales como cebadores, fragmentos o nucleótidos antisentido, que pueden ser utilizadas para determinar el nivel de expresión de CXCR-4 en una muestra de cultivo tisular o celular como pronóstico de un fenotipo celular precanceroso o transformado, o para inhibir la expresión de CXCR-4 para su uso en el tratamiento o prevención de un fenotipo celular precanceroso o transformado. En una realización específica, el gen CXCR-4 es un gen humano y la proteína CXCR-4 es una proteína humana.

- La presente invención también se refiere a inhibidores de las actividades de CXCR-4 relacionadas con la transformación celular. El CXCR-4 es un receptor acoplado a la proteína G, ya conocido, que interviene en la transducción de señales. La presente invención se refiere a fragmentos o antagonistas, anticuerpos, o pequeños compuestos peptídicos capaces de inhibir o competir con ligandos que se unen al CXCR-4 inhibiendo así la actividad de CXCR-4. La invención también se refiere a fragmentos de péptidos (y a derivados y análogos de los mismos) que comprenden uno o más dominios de una proteína CXCR-4 que pueden ser utilizados para evitar que los ligandos se unan al CXCR-4. También se presentan anticuerpos contra el CXCR-4, y contra derivados CXCR-4 y análogos de los mismos. Esta descripción también presenta métodos para la producción de las proteínas CXCR-4, de derivados y análogos de las mismas, a través de, por ejemplo, medios recombinantes.
- La presente descripción también se refiere a un ensayo de cribado para identificar compuestos capaces de inhibir la expresión génica de CXCR-4 o la actividad del producto génico como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento y/o prevención de la tumorigénesis. En particular, la presente descripción se refiere a líneas celulares huésped o animales transgénicos que expresan el CXCR-4 a altos niveles y resultan útiles como herramientas para ensayos de cribado para la identificación de agentes capaces de inhibir la expresión y/o actividad de CXCR-4 como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento y prevención de la tumorigénesis.
- La presente invención también se refiere a composiciones basadas en proteínas y ácidos nucleicos CXCR-4 para su uso en métodos terapéuticos y de diagnóstico. Los compuestos terapéuticos de la invención son anticuerpos frente a CXCR-4; ácidos nucleicos que codifican las proteínas CXCR-4, análogos o derivados de las mismas; y ácidos nucleicos antisentido CXCR-4.
- La invención proporciona compuestos que reducen o antagonizan (inhiben) la función de CXCR-4 (por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas) para su uso en el tratamiento de trastornos de sobreproliferación (por ejemplo, tumores, cáncer y trastornos hiperproliferativos) mediante la administración de los compuestos.
- La descripción también proporciona métodos para el tratamiento de trastornos en los que tiene lugar una proliferación (crecimiento) celular deficiente o en los que la proliferación celular se desea de otro modo (por ejemplo, trastornos degenerativos, deficiencias de crecimiento, lesiones, traumas físicos) mediante la administración de compuestos capaces de promover la actividad de CXCR-4 (por ejemplo, un agonista de CXCR-4; ácidos nucleicos que codifican el CXCR-4).
- La descripción también proporciona modelos de animales, métodos de diagnóstico y métodos de cribado para la predisposición a trastornos y métodos para la identificación de agonistas y antagonistas de CXCR-4.

### 3.1. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- El nombre de un gen subrayado o en cursiva, tal y como se expresa aquí, indicará el gen, para diferenciarlo de su producto proteico codificado, que se expresa por el nombre del gen en ausencia de subrayado o cursiva. Por ejemplo, "CXCR-4" significa el gen CXCR-4, mientras que "CXCR-4" indica el producto proteico del gen CXCR-4.
- Los términos siguientes, tal y como se expresan aquí, tendrán los significados indicados.
- Secuencias codificadoras o nucleótidos de CXCR-4: secuencias de ADN que codifican transcritos de ARNm CXCR-4, fragmentos de proteínas, polipéptidos o péptidos de la proteína CXCR-4, y proteínas de fusión de CXCR-4, y secuencias de ARN correspondientes a los transcritos de ARNm CXCR-4 y secuencias de ARN que son complementarias al transcrito de ARNm, secuencias de nucleótidos de CXCR-4 que comprenden ARN, ADN, incluidos el ADN genómico (por ejemplo, el gen CXCR-4) y el ADNc.
- CXCR-4: productos génicos, por ejemplo, transcritos y la proteína CXCR-4. A los polipéptidos o fragmentos de péptidos de la proteína se les denomina polipéptidos CXCR-4 o péptidos CXCR-4. En la presente invención, a las fusiones de los fragmentos de proteínas, polipéptidos o péptidos CXCR-4 con una proteína no relacionada se les denomina proteínas de fusión de CXCR-4.
- Tal y como se utilizan aquí dentro, los términos siguientes tendrán las abreviaturas indicadas.
- CD: dominio citoplásmico
- DD-PCR: visualización diferencial - reacción en cadena de la polimerasa
- ECD: dominio extracelular
- FNHA: astrocitos humanos fetales normales
- GMTT: tejido tumoral de glioblastomas multiformes
- MTB: hibridación de múltiples tejidos

MTT: tejido tumoral de meningiomas

NBT: tejido cerebral normal

ORF: marco de lectura abierta

RT-PCR: transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa

5 TM: dominio transmembrana

UTR: región no traducida

Líneas celulares de tumores cerebrales:

CCF-STTG1: astrocitoma de grado IV

D283 Med: meduloblastoma

10 DBTRG-05MG: glioblastoma multiforme

Hs 683: glioma

IMR-32: neuroblastoma

PFSK-1: tumor neuroectodermal primitivo

SW 1783: astrocitoma de grado III.

15

#### 4. DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A-C. Identificación del gen *CXCR-4*. Las subfiguras A y B muestran ensayos de expresión hibridados con ADNc etiquetado con <sup>32</sup>P del tejido Normal y Tumoral, respectivamente. El gen *CXCR-4* se indica en la subfigura B con una flecha gruesa. Los otros dos genes expresados a niveles similares tanto en el tejido normal como en el tumoral se indican con flechas pequeñas. En la subfigura C se muestra el análisis de la expresión de *CXCR-4* en un tejido Normal y Tumoral (N y T) utilizando la técnica RT-PCR específica del gen. El gen de mantenimiento (DI-2) se indica con la letra H.

20

Figura 2A-B. Análisis de la expresión de *CXCR-4* en el GMTT y el NBT utilizando la técnica de hibridación in situ. En la subfigura A se muestra el GMTT hibridado con una sonda de sentido. En la subfigura B se muestra el GMTT hibridado con una sonda antisentido *CXCR-4*. La expresión de *CXCR-4* se expresa con flechas.

25

Figura 3A-C. Expresión de *CXCR-4* en líneas celulares y tejidos primarios tumorales humanos. La RT-PCR específica del gen se llevó a cabo utilizando cebadores específicos al *CXCR-4* y al DI-2. En la subfigura A se muestra la expresión de *CXCR-4* en el NBT, FNHA y en tres líneas celulares y tejidos de glioblastoma, respectivamente. En los paneles B y C se muestra la expresión de *CXCR-4* en líneas celulares y tejidos de tumores cerebrales, respectivamente.

30

Figura 4A-B. Expresión de *CXCR-4* en tejidos de tumores de mama y líneas celulares. El ARN total se aisló utilizando la solución ARNzol de Gibco/BRL (Gaithersburg, MD). Tras un tratamiento con DNasa 1, se llevó a cabo una RT-PCR y un Southern blot. En los paneles A y B se muestra la expresión de *CXCR-4* en el tejido primario (N=normal y T=tumoral) y en líneas celulares de mama, respectivamente.

35

Figura 5A-B. Expresión de *CXCR-4* en líneas celulares cancerosas y tejidos normales. Para estudiar la expresión de *CXCR-4* en líneas celulares cancerosas humanas (Panel A) y en tejidos normales humanos (Panel B), se adquirieron una línea celular cancerosa y tres hibridaciones de múltiples de tejidos normales humanos (MNHTB) de Clontech (Palo Alto, CA). Estas hibridaciones contenían 2µg de ARNm poliA+ puro. Los MNHTB se hibridaron previamente en una solución tampón de hibridación rápida (Clontech) durante 3-4 horas. La hibridación se realizó con una sonda *CXCR-4* de 0,55 Kb etiquetada mediante el sistema Multiprime (posiciones 1591-1618). A continuación se retiró la sonda *CXCR-4* y el gen  $\beta$  actina humano se utilizó como control interno.

40

Figura 6. Expresión de *CXCR-4* en distintas regiones del cerebro humano normal. Para estudiar la expresión de *CXCR-4* en un ser humano normal, se adquirió una hibridación de un cerebro humano normal en Clontech (Palo Alto, CA). Esta hibridación contenía 2 µg de ARNm poliA+ en cada calle. La prehibridación de la hibridación se realizó en una solución tampón de hibridación rápida (Clontech) durante 3-4 horas. La hibridación se realizó con una sonda *CXCR-4* de 0,55 Kb etiquetada mediante el sistema Multiprime (posiciones 1591-1618). A continuación se retiró la sonda *CXCR-4* y el gen  $\beta$  actina humano se utilizó como control interno. La expresión relativa de *CXCR-4* se calculó según se ha descrito anteriormente (Sehgal et al., 1997 Int. J. Cancer 71:565).

45

Figura 7A-B. Análisis de conservación de la secuencia de CXCR-4 en distintos animales. Se adquirió una membrana de hibridación de animales que contiene 5µg de ADN genómico predigerido (EcoRI) en Clontech (Palo Alto, CA). En la subfigura A se muestra el gel manchado con bromuro de etidio y en la subfigura B se muestra el autorradiograma. Para aislar el fragmento de CXCR-4 de 0,55 Kb para su etiquetado como sonda, se utilizaron 125 ng de ADNc (preparados utilizando un cebador oligodT y hexámero aleatorio de la línea celular de neuroblastoma humano) como plantilla. La amplificación de la PCR del fragmento de CXCR-4 se realizó utilizando cebadores específicos al gen (5'CTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACAT3' y 5'TGATTTTCAGCACCTACAGTGACAGTCT3') utilizando las condiciones de PCR descritas aquí dentro. La banda genómica de CXCR-4 en la calle que corresponde a ratón se indica mediante la flecha en la subfigura B.

Figura 8. Hibridación *in situ* de CXCR-4 en embriones de ratón. Subfiguras A-D: A=embrión entero de 8 días, B=embrión de 9 días (región de la cabeza), C=embrión de 9 días (región del órgano), D=embrión de 10 días (región del órgano), las Subfiguras E-F son iguales a los A-D, excepto que han sido hibridados con la sonda CXCR-4 de sentido. Subfiguras I-O: I=embrión de 10 días (región de la cabeza), J=embrión de 11 días (región del corazón), K=embrión de 11 días (región de la frente), L=embrión de 13 días (médula espinal), M=embrión de 15 días (glándula pituitaria), N=embrión de 15 días (cerebro anterior), O=costillas del embrión de 14 días (cerca de la columna) y O=embrión de 16 días para las extremidades. Con las flechas se indican los altos niveles de expresión de CXCR-4.

Figura 9A-D. Efecto de la sobreexpresión de CXCR-4 en la línea celular de glioblastoma 5GB. En los paneles A y B se muestran células transfectadas con pCMV-neoCS (CXCR-4 de sentido). En los paneles C y D se muestran células transfectadas con pCMV-neoCA (antisentido CXCR-4). Las excrescencias de neuritas en las células transfectadas con pCMV-neoCA se indican con flechas en la subfigura C. 48 horas después de la transfección, se seleccionaron células en G418 (1000 µg/ml) durante 3 semanas. Se observó la morfología celular bajo el microscopio de luz invertida con un aumento de 5x. Las células del glioblastoma GB5 (A y B) fueron transfectadas con un pCMV-neo o pCMV-neoCA (antisentido CXCR-4). La excrescencia de neuritas en las células del glioblastoma GB1690 (C y D) transfectadas con pCMV-neo o pCMV-neoCA (antisentido CXCR-4) respectivamente se indican con las flechas. La inmunocitoquímica en las células transfectadas antisentido mostró una reducción del 50% en la expresión de CXCR-4 y un aumento en la expresión de GFAP.

Figura 10A-C. Efecto de la sobreexpresión de CXCR-4 en la línea celular de glioblastoma GB1690. En los paneles A, B y C se muestran células transfectadas con pCMV-neo, pCMV-neoCS (CXCR-4 de sentido) y pCMV-neoCA (antisentido CXCR-4) respectivamente. Las excrescencias de neuritas en las células transfectadas con pCMV-neoCA se indican mediante flechas en la subfigura C.

Figura 11A-B. Efecto de la expresión de CXCR-4 en las líneas de celulares de glioblastoma GB1690 (Figura 11B) y HTB-16 (Figura 11A). En pocas palabras, se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos 1000 células que incluían células de tipo salvaje y de expresión mutante. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y se añadieron 80µl de colorante. Pasadas 4 horas, se añadieron 15µl de una solución de parada y se incubaron durante 18 horas. A continuación se registró la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas ELISA. Los puntos del gráfico representan la media de los dos experimentos realizados con muestras por triplicado.

Figura 12A-E. Efecto de la sobreexpresión de CXCR-4 en la formación de colonias en el agar suave de la línea celular de glioblastoma BG1690. Las células GB1690 que se transfectaron con el vector solo y con el CXCR-4 en la dirección del sentido se tripsinizaron. Aproximadamente, un  $1 \times 10^6$  de las células se mezcló con agar al 0,26%. A continuación, las células se pusieron en placas encima de una capa de agar al 0,65% en placas de Petri de 60 mm y se incubaron a 37°C durante 2-4 semanas. Las células fueron alimentadas con un medio que contenía suero cada 10 días. Las colonias se contaron con el microscopio de luz invertida. Figura 12A-B, vector pCMV-neo solo; 12C-D, pCMV-neoCS; 12E es un histograma del número de colonias.

Figura 13. Efecto del tratamiento con anticuerpos contra el CXCR-4 en la proliferación de células tumorales. Se hizo un anticuerpo policlonal (conejo antihumano) contra el CXCR-4 frente a un péptido sintético (MEGISIYSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANFNK) correspondiente a los 15 primeros aminoácidos de los 38 de la proteína CXCR-4. Se pusieron aproximadamente  $1 \times 10^3$  células (NIH3T3 y Glioblastoma) en placas de Petri de 60 mm. 48 horas después de la puesta en las placas, se añadió una dilución final de 1/50 de anticuerpo policlonal contra el CXCR-4 o suero preimmune en el medio de cultivo. Las células se recogieron después de 190 horas y se contaron en un contador de células. Los resultados representan la media del mismo experimento realizado por triplicado.

Figura 14. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de CXCR-4 humano.

Figura 15. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del SDF-1 humano.

Figura 16. Efecto del tratamiento con anticuerpos del SDF-1 en la proliferación de células tumorales. A R&D systems (Minneapolis, MN) se le compró un anticuerpo monoclonal contra el SDF-1. Se pusieron aproximadamente  $1 \times 10^3$  células (NIH3T3 y Glioblastoma) en placas de Petri de 60 mm. Veinticuatro horas después de la puesta en placas, se añadió al medio de cultivo un anticuerpo anti-SDFβ o suero preimmune hasta alcanzar una concentración final de 40

µg/ml. Se recogieron células cada 48 horas y se contaron en un contador de células. Los resultados representan la media del mismo experimento realizado por triplicado.

## 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación de una nueva función de CXCR-4 en la transformación celular y en la proliferación celular aberrante. En particular, la presente invención se refiere a la expresión génica alterada de CXCR-4 en una serie de tumores primarios y líneas de células derivadas de tumores, además de a la expresión génica alterada de los ligandos de CXCR-4. La presente invención también se refiere, en parte, al sorprendente hallazgo de los solicitantes de que el CXCR-4, en presencia de su ligando, el SDF0-1, es necesario para la proliferación de las células tumorales y que la inhibición de la expresión génica de CXCR-4 o la inhibición de la actividad de CXCR-4 en las células transformadas invierte el fenotipo transformado.

La presente invención se refiere a compuestos y a métodos para la detección de la expresión o actividad génicas aberrantes de CXCR-4 como herramienta de diagnóstico o pronóstico para indicar un fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso. La presente descripción también se refiere a compuestos y métodos para la detección de la expresión o actividad génicas aberrantes de SDF-1 como herramienta de diagnóstico o pronóstico para indicar un fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso. La presente invención también se refiere a compuestos y métodos para la modulación de la expresión o actividad génicas de CXCR-4 como método para el tratamiento o prevención de un fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso. A este respecto, en la presente invención se presentan secuencias de nucleótidos de genes CXCR-4 y secuencias de aminoácidos de sus proteínas codificadas. En la invención también se presentan fragmentos de proteínas CXCR-4 y otros derivados y análogos. Los ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos o derivados también se encuentran dentro del alcance de la invención. En la invención se presentan genes CXCR-4 y sus proteínas codificadas de seres humanos y los genes relacionados (homólogos) en otras especies. En realizaciones específicas, los genes y proteínas CXCR-4 son de vertebrados y, más concretamente, de mamíferos. En una realización preferente de la invención, los genes y proteínas CXCR-4 son de origen humano. Se presenta la producción de los ácidos nucleicos, proteínas y derivados a través de métodos recombinantes por ejemplo.

El CXCR-4 es un gen identificado a través del método de la invención, que se expresa a altos niveles en el tejido del glioblastoma multiforme además de en ciertos tipos de tumores y cánceres.

En la descripción también se presentan derivados CXCR-4 y análogos de la invención que son funcionalmente activos, a saber, son capaces de mostrar una o más de las actividades descritas aquí dentro asociadas a una proteína CXCR-4 de longitud completa (proteína salvaje). Tales actividades funcionales incluyen, entre otras, la antigenicidad, a saber, la capacidad de unirse (o competir con CXCR-4 para unirse) a un anticuerpo anti-CXCR-4, inmunogenoicidad, a saber, la capacidad de generar un anticuerpo que se une al CXCR-4, la capacidad de unirse (o competir con CXCR-4 para unirse) a un ligando para CXCR-4. En la invención también se presentan fragmentos de CXCR-4 (y derivados y análogos de los mismos) que comprenden uno o más dominios de la proteína CXCR-4. También se presentan anticuerpos contra CXCR-4, sus derivados y análogos.

En la presente invención también se presentan composiciones basadas en proteínas y ácidos nucleicos de CXCR-4 y anticuerpos anti-CXCR-4 para su uso en métodos terapéuticos y de diagnóstico. En la invención se presentan compuestos que reducen la actividad de CXCR-4 (por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido CXCR-4), para su uso en el tratamiento de trastornos de sobreproliferación (por ejemplo, cáncer y trastornos hiperproliferativos) mediante la administración de los compuestos.

En la descripción también se presentan métodos de tratamiento de trastornos en los que interviene una proliferación celular deficiente o en los que la proliferación celular (crecimiento) es deseable de cualquier otro modo (por ejemplo, deficiencias de crecimiento, trastornos degenerativos, lesiones, traumas físicos) mediante la administración de compuestos capaces de impulsar la función de CXCR-4.

En la presente descripción también se presentan ensayos de cribado para la identificación de nuevos agentes capaces de intervenir en la expresión génica de CXCR-4 o en la actividad proteica de CXCR-4, incluida la interacción con ligandos, por ejemplo, el SDF-1, y que, por tanto, son agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento o prevención de la transformación celular, o fenotipos precancerosos o cancerosos, a saber, tumorigénesis. Los ensayos de cribado de la presente descripción pueden funcionar para identificar nuevos agentes exógenos o endógenos capaces de inhibir la expresión génica de CXCR-4 o inhibir la interacción entre CXCR-4 y su ligando, por ejemplo, el SDF-1. Puede hacerse uso de varios protocolos y técnicas para la identificación de fármacos capaces de inhibir la expresión génica de CXCR-4 y/o la actividad de CXCR-4, y, por tanto, inhibir la participación de CXCR-4 en la actividad proliferativa celular aberrante. Tales agentes identificados son útiles en el tratamiento de huéspedes que demuestran un fenotipo celular transformado o un comportamiento proliferativo celular aberrante y, convenientemente, podrían resultar muy eficaces en el tratamiento y/o prevención de la tumorigénesis.

En la presente descripción también se presentan composiciones farmacéuticas que contienen los nuevos agentes identificados a través de los ensayos de cribado descritos aquí dentro. En la invención se presentan modalidades terapéuticas y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la tumorigénesis y la prevención de fenotipos

transformados. Las modalidades terapéuticas de la presente invención también comprenden terapias de combinación en las que se administra un agente capaz de inhibir la expresión y/o actividad génicas del CXCR-4, y al menos otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, bien concurrentemente, por ejemplo, como mezcla, o por separado pero simultáneamente o concurrentemente, o secuencialmente.

- 5 Las nuevas combinaciones terapéuticas de la presente invención proporcionan un medio de tratamiento que puede, no sólo reducir la dosis efectiva de cualquier fármaco requerido para la antitransformación o antitumorigénesis, reduciendo así la toxicidad, sino que puede mejorar el efecto terapéutico absoluto como resultado de un ataque a la proliferación celular aberrante a través de diversos mecanismos.

- 10 La descripción se ilustra a través de ejemplos presentados más abajo en los que se presenta, entre otras cosas, el aislamiento y la caracterización de CXCR-4, y patrones de expresión de CXCR-4 en ciertos tumores (véase la Sección 6). Cualquier ejemplo que no forme parte de la invención, se presenta a efectos de comparación.

Con objeto de que la presentación de la invención sea más fácil de comprender, y sin carácter limitativo alguno, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que se indican a continuación.

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CXCR-4 EN LA TRANSFORMACIÓN

- 15 La presente invención se refiere a la nueva función de CXCR-4 en la promoción de la transformación celular y la tumorigénesis. En particular, la presente invención se refiere a los descubrimientos de los Solicitantes de que (a) el CXCR-4 está sobreexpresado en el tejido tumoral de glioblastomas multiformes y otros muchos tumores primarios; (b) la expresión del gen *CXCR-4* es necesaria para la proliferación continua de las células cancerígenas del glioblastoma y el bloqueo de su función génica causa un arresto del crecimiento; y (c) la sobreexpresión de CXCR-4  
20 en la orientación del sentido da como resultado una proliferación celular aumentada y rápida y la formación de colonias en agar suave.

- La presente invención también se refiere a los descubrimientos de los Solicitantes de que el CXCR-4 está sobreexpresado en muchas líneas celulares derivadas de tumores cerebrales y tejidos primarios de tumores cerebrales, incluidas las líneas celulares de tumores humanos neuroblastoma y neuroectodérmicos, líneas celulares  
25 de meduloblastoma y astrocitoma de grado III y tumores glioma y meningioma primarios. Además, se descubrió que el CXCR-4 estaba sobreexpresado en tejidos de tumores de mama, líneas celulares de leucemia linfoblástica, líneas celulares de linfoma de Burkitt, líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón y melanoma.

- La presente invención se refiere a la función de CXCR-4 en la promoción de la transformación celular y tumorigénesis, y proporciona métodos que incluyen el uso de ácidos nucleicos *CXCR-4* y ácidos nucleicos que se  
30 hibridan con o complementan los ácidos nucleicos *CXCR-4*, como herramientas de diagnóstico y pronóstico para la detección de fenotipos transformados, precancerosos y cancerosos. En la presente invención se presentan ácidos nucleicos *CXCR-4* y aquellos que son complementarios a y/o se hibridan con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el CXCR-4 para su uso como agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de fenotipos transformados, precancerosos y cancerosos. En particular, en la invención se presentan composiciones que  
35 comprenden secuencias de ácidos nucleicos inhibidoras de la expresión de CXCR-4 como agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de fenotipos transformados, precancerosos y cancerosos.

### 5.2. LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE CXCR-4, POLIPÉPTIDOS Y ANTICUERPOS COMO AGENTES DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS Y COMPONENTES PARA ENSAYOS DE CRIBADO

- 40 La presente invención se refiere al uso de agentes para la detección de la expresión génica aberrante de *CXCR-4* como herramientas de diagnóstico o pronóstico para detectar un estado fenotípico transformado, precanceroso o canceroso. Entre las herramientas de diagnóstico o pronóstico que pueden ser utilizadas según la presente invención cabe incluir, entre otras, (a) ácidos nucleicos que se hibridan con o son complementarios a la secuencia  
45 de nucleótidos de *CXCR-4*, (b) polipéptidos, fragmentos de péptidos o moléculas sintéticas que se unen al dominio de unión del ligando de CXCR-4; y (c) anticuerpos que se unen al CXCR-4.

- La presente invención se refiere a agentes que inhiben la expresión génica y/o la actividad proteica de CXCR-4 para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de un fenotipo transformado o precanceroso, o  
50 cáncer o tumorigénesis. Entre los agentes terapéuticos que pueden ser utilizados según la presente invención cabe incluir, entre otros, (a) ácidos nucleicos que inhiben la expresión génica de *CXCR-4*, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas o moléculas de triple hélice complementarias al CXCR-4; (b) polipéptidos, péptidos, anticuerpos, pequeñas moléculas orgánicas o moléculas sintéticas que inhiben la actividad de CXCR-4 o evitan que el CXCR-4 se una a su ligando; y (c) péptidos, polipéptidos, anticuerpos, pequeñas moléculas orgánicas o moléculas sintéticas que actúan como antagonistas de la actividad de CXCR-4.

En la presente descripción se presentan ensayos de cribado para la identificación de agentes capaces de inhibir la expresión y/o actividad génicas de *CXCR-4*. En una realización de la presente descripción, un componente importante de los ensayos de cribado de la presente invención son secuencias de nucleótidos codificadoras que codifican proteínas, polipéptidos y péptidos *CXCR-4*. La presente descripción también se refiere a (a) vectores de ADN que contienen cualquiera de las secuencias que codifican el *CXCR-4* antedichas y/o sus complementos; (b) vectores de expresión de ADN que contienen cualquiera de las secuencias codificadoras de *CXCR-4* antedichas asociadas de forma operativa a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificadoras en la célula huésped; y (c) células huéspedes obtenidas por ingeniería genética que contienen cualquiera de las secuencias codificadoras de *CXCR-4* antedichas asociadas a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificadoras en la célula huésped.

En la presente descripción se presenta el uso de agentes 30 para la detección de la expresión génica aberrante del SDF-1 como herramientas de diagnóstico o pronóstico para detectar un estado fenotípico transformado, precanceroso o canceroso. La presente descripción se refiere al uso de agentes que inhiben la expresión génica y/o la actividad proteica del SDF-1 para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de un fenotipo transformado o precanceroso, o cáncer o tumorigénesis. La presente descripción también se refiere a ensayos de cribado para la identificación de agentes capaces de inhibir la expresión y/o actividad génicas del SDF-1. La presente invención se describe en términos de *CXCR-4* a modo de ejemplo, y no a modo de limitación para excluir el SDF-1. La presente descripción incluye, entre otros, (a) ácidos nucleicos que se hibridan con o son complementarios a la secuencia codificadora del SDF-1 (véase la Figura 15); y (b) polipéptidos, péptidos, anticuerpos, pequeñas moléculas orgánicas o moléculas sintéticas que pueden ser utilizados para la detección o inhibición de la expresión o actividad génicas del SDF-1.

#### 5.2.1. LOS ÁCIDOS NUCLEICOS DE *CXCR-4*

La invención se refiere a las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos de *CXCR-4*. En realizaciones específicas, los ácidos nucleicos de *CXCR-4* comprenden las secuencias de ADNc de ID SEC N°, o las regiones codificadoras de las mismas, o los ácidos de las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína *CXCR-4* (por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de ID SEC N°: ). Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden tener una sola cadena o dos. La invención también se refiere a ácidos nucleicos hibridables con o complementarios a las secuencias antedichas. En algunos aspectos específicos, se presentan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia complementaria a al menos 10, 25, 50, 100, 200 ó 250 nucleótidos contiguos de un gen *CXCR-4*. En una realización específica, se presenta un ácido nucleico hibridable con un ácido nucleico *CXCR-4* (por ejemplo, que tiene la ID SEC N°:), o con un ácido nucleico que codifica un derivado *CXCR-4*, bajo condiciones de baja rigurosidad.

A modo de ejemplo y no en sentido excluyente, los procedimientos que hacen uso de tales condiciones de baja rigurosidad son los siguientes (véase también Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792): Se pretratan filtros que contenían ADN durante 6 horas a 40°C en una solución que contiene formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 1% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se llevaron a cabo en la misma solución con las siguientes modificaciones: PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, sulfato de dextrano al 10% (p/vol) y se utiliza una sonda de 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm etiquetada con <sup>32</sup>P. Los filtros se incuban en una mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40°C, y después se lavan durante 1,5 horas a 55°C en una solución que contiene 2X SSC, Tris HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. La solución de lavado se sustituye por una solución fresca y se incuba durante 1,5 horas más a 60°C. Los filtros se secan con papel de filtro y se exponen para una autorradiografía. En caso necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se reexponen a la película. Pueden usarse otras condiciones de baja rigurosidad que son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, las que se emplean para hibridaciones de especies cruzadas).

En otra realización específica, se presenta un ácido nucleico hibridable con un ácido nucleico *CXCR-4* bajo condiciones de alta rigurosidad. A modo de ejemplo, y no en sentido excluyente, los procedimientos que hacen uso de tales condiciones de alta rigurosidad son las siguientes: Se lleva a cabo una prehibridación de los filtros que contienen ADN durante 8 horas por la noche a 65°C en un tampón compuesto de 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridan durante 48 horas a 65°C en una mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y una sonda 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm etiquetada con <sup>32</sup>P. El lavado de los filtros se hace a 37°C durante 1 hora en una solución que contiene 2X SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. A esto le sigue un lavado en 0,1X SSC a 50°C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Otras condiciones de alta rigurosidad que pueden utilizarse son bien conocidas en la técnica.

En otra realización específica, se presenta un ácido nucleico hibridable con un ácido nucleico de *CXCR-4* bajo condiciones de rigurosidad moderada.

Pueden utilizarse otras muchas condiciones de rigurosidad que promuevan la hibridación del ácido nucleico. Por ejemplo, puede utilizarse una hibridación en 6x SSC a unos 45° C, seguido de un lavado en 2xSSC a 50° C. Alternativamente, la concentración de sal en el paso de lavado puede variar de unas condiciones de baja rigurosidad

de unos 5xSSC a 50° C, a unas de rigurosidad moderada de unos 2xSSC a 50°C, a unas de alta rigurosidad de unos 0,2x SSC a 50° C. Además, la temperatura del paso de lavado se puede aumentar de las condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, a unas condiciones de rigurosidad moderada a unos 42° C, a unas de alta rigurosidad a unos 65° C. Otras condiciones incluyen, entre otras, la hibridación a 68° C en 40 mM de NaHP04 (pH 7,2)/ EDTA 1 mM/ SDS al 7%, o la hibridación en formamida al 50%/0,25M de NaHP04 (pH 7,2)/0,25 M de NaCl/EDTA 1 mM/SDS al 7%; seguido de un lavado en 40 mM de NaHP04 (pH 7,2)/EDTA 1 mM/SDS al 5% a 42° C o en 40 mM NaHP04 (pH7,2) EDTA 1 mM/SDS al 1 % a 50° C. Se pueden variar tanto la temperatura como la sal, o alternativamente, una de las variables o la otra puede permanecer constante mientras la otra se cambia.

Las condiciones de rigurosidad baja, moderada y alta son bien conocidas por aquellos versados en la materia y variarán de manera previsible dependiendo de la composición base de la secuencia de ácidos nucleicos particular y del organismo específico del que se deriva la secuencia de ácidos nucleicos. Para obtener información sobre dichas condiciones consulte, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57; y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

También se presentan ácidos nucleicos que codifican derivados y análogos de las proteínas CXCR-4 (véase la Sección 5.2.2), y ácidos nucleicos antisentido CXCR-4. Es fácil de entender que, tal y como se usa en este documento, se construirá un "ácido nucleico que codifica un fragmento ó porción de una proteína CXCR-4" refiriéndonos a un ácido nucleico que sólo codifica el citado fragmento ó porción de la proteína CXCR-4 y no las otras porciones contiguas de la proteína CXCR-4 como una secuencia continua.

También se presentan fragmentos de ácidos nucleicos de CXCR-4 que comprenden regiones conservadas entre otros ácidos nucleicos de CXCR-4, de la misma especie o diferente. También se presentan ácidos nucleicos que codifican uno o más dominios de CXCR-4.

A continuación, se presentan realizaciones específicas para la clonación de un gen CXCR-4 presentadas a modo de ejemplo particular y no en un sentido excluyente:

Para la clonación de la expresión (una técnica bien conocida en la materia), se crea una librería de expresiones mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se aísla un ARNm (por ejemplo, humano), se crea un ADNc y se liga a un vector de expresión (por ejemplo, un derivado bacteriófago) de modo que sea capaz de ser expresado por la célula huésped en la que se introduce después. A continuación, pueden utilizarse varios ensayos de cribado para seleccionar el producto CXCR-4 expresado. En una realización, pueden utilizarse anticuerpos anti-CXCR-4 para la selección.

En otra realización, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia deseada en una librería genómica o de ADNc antes de la selección. En la PCR, como cebadores pueden utilizarse cebadores de oligonucleótidos que representen secuencias de CXCR-4 conocidas. En un aspecto preferente, los cebadores de oligonucleótidos representan al menos una parte de la secuencia de CXCR-4 presentada en la Figura. Los oligonucleótidos sintéticos pueden utilizarse como cebadores a amplificar por secuencias de PCR desde una fuente (ARN o ADN), preferentemente una librería de ADNc, de interés potencial. La PCR puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un ciclador térmico Perkin-Elmer Cetus y polimerasa Taq (Amplificación génica). El ADN que se está amplificando puede incluir ARNm, ADNc o ADN genómico de cualquier especie eucariótica. Si se desea, se puede optar por sintetizar varios cebadores redundantes diferentes para utilizarlos en las reacciones PCR. También se puede variar la rigurosidad de las condiciones de hibridación utilizadas al cebar las reacciones PCR, para poder aislar más o menos grados de secuencias de nucleótidos de manera similar entre la secuencia conocida de nucleótidos del CXCR-4 y el homólogo del ácido nucleico. Para la hibridación de especies cruzadas, lo mejor son unas condiciones de baja rigurosidad. Para la hibridación de especies cruzadas, lo mejor son unas condiciones de rigurosidad moderada. Una vez finalizada con éxito la amplificación de un segmento de un homólogo de CXCR-4, ese segmento se puede clonar y secuenciar molecularmente y utilizar como sonda para aislar un clon completo de ADNc o genómico. Esto, a su vez, permitirá determinar la secuencia de nucleótidos completa del gen, el análisis de su expresión y la producción de su producto proteico para su análisis funcional, tal y como se describe más abajo. De este modo, pueden identificarse genes adicionales que codifican proteínas CXCR-4 y análogos CXCR.4.

El objetivo de los métodos de arriba no es limitar la siguiente descripción general de los métodos a través de los cuales pueden obtenerse los clones CXCR-4.

Cualquier célula eucariótica puede servir potencialmente como fuente de ácidos nucleicos para la clonación molecular del gen CXCR-4. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el CXCR-4 se pueden aislar de fuentes de vertebrados, incluida fuentes mamíferas, tales como porcina, bobina, felina, y equina, canina, humana, además de fuentes adicionales de primates, aviares, reptiles, anfibias, piscinas, etc., fuentes invertebradas como insectos, plantas, etc. El ADN puede obtenerse mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica del ADN clonado (por ejemplo, una "librería" de ADN), mediante síntesis química, mediante la clonación de ADNc o mediante la clonación ADN genómico, o fragmentos del mismo, purificado a partir de la célula deseada. (Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford,

U.K. Vol. I, II.) Los clones derivados del ADN genómico pueden contener regiones de ADN reguladoras e intrones además de regiones codificadoras; los clones derivados del ADNc sólo contendrán secuencias de exones. Cualquiera que sea la fuente, el gen se debe clonar molecularmente en un vector adecuado para la propagación del gen.

En la clonación molecular del gen a partir de ADN genómico, se generan fragmentos de ADN, algunos de los cuales codificarán el gen deseado. El ADN se puede escindir en sitios específicos utilizando distintas enzimas de restricción. Alternativamente, puede utilizarse ADNsa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN, o el ADN se puede cortar físicamente por sonicación, por ejemplo. Los fragmentos lineales de ADN pueden separarse según el tamaño mediante técnicas estándar incluidas, entre otras, la electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida y una cromatografía de columna.

Una vez generados los fragmentos de ADN, la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el gen deseado se puede lograr de distintas maneras. Por ejemplo, si una cantidad o una porción de un gen CXCR-4 (de cualquier especie) o su ARN específico, o un fragmento del mismo (véase la Sección 5.6) se encuentra disponible y se puede purificar y etiquetar, los fragmentos de ADN generados se pueden cribar mediante una hibridación del ácido nucleico con la sonda etiquetada (Benton and Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961). Los fragmentos de ADN con una homología sustancial con la sonda se hibridarán. También es posible identificar el fragmento apropiado por digestión(es) con la enzima de restricción y por comparación de los tamaños de los fragmentos con los esperados según un mapa de restricción conocido si éste está disponible. Puede llevarse a cabo una selección adicional basándose en las propiedades del gen. Alternativamente, puede detectarse la presencia del gen mediante ensayos basados en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, entre los clones de ADNc, o los clones de ADN cuyo híbrido es selector de los ARNm apropiados, se pueden seleccionar los que producen una proteína que, por ejemplo, tiene una migración electroforética similar o idéntica, un comportamiento por isoelectroenfoque, mapas de digestión proteolítica, promoción de la actividad de proliferación celular, actividad de unión de sustratos, o propiedades antigénicas de CXCR-4. Si hay disponible un anticuerpo contra el CXCR-4, la proteína CXCR-4 se puede identificar uniendo el anticuerpo etiquetado a los clones que sintetizan el CXCR-4 presuntamente, en un procedimiento tipo ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

El gen CXCR-4 también se puede identificar mediante la selección del ARNm a través de una hibridación del ácido nucleico seguido de una traducción in vitro. En este procedimiento se usan fragmentos para aislar ARNm complementarios por hibridación. Tales fragmentos de ADN pueden representar un ADN de CXCR-4 purificado y disponible de otras especies. Los análisis de inmunoprecipitación o ensayos funcionales (por ejemplo, capacidad de agregación in vitro; unión al receptor; véase más abajo) de los productos de traducción in vitro de los productos aislados de los ARNm aislados, identifican el ARNm y, por tanto, los fragmentos de ADN complementarios que contienen las secuencias deseadas. Además, pueden seleccionarse ARNm específicos por absorción de polisomas aislados a partir de células para inmovilizar anticuerpos dirigidos específicamente contra la proteína CXCR-4. Se puede sintetizar un ADNc CXCR-4 radioetiquetado utilizando el ARNm seleccionado (de los polisomas absorbidos) como plantilla. El ARNm o ADNc radioetiquetados pueden utilizarse entonces a modo de sonda para identificar los fragmentos de ADN CXCR-4 de entre otros fragmentos de ADN genómico.

Entre las alternativas para aislar el ADN genómico CXCR-4 cabe incluir, entre otras, la sintetización química de la propia secuencia del gen a partir de una secuencia conocida o preparar ADNc del ARNm que codifica la proteína CXCR-4. Por ejemplo, se puede aislar el ARN para la clonación del ADNc del gen CXCR-4 a partir de células que expresan CXCR-4. Son posibles otros métodos dentro del alcance de la descripción.

El gen identificado y aislado se puede introducir entonces en un vector de clonación apropiado. Pueden utilizarse un gran número de sistemas vector-huésped conocidos en la técnica. Entre los posibles vectores cabe incluir, entre otros, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con las células huésped utilizadas. Tales vectores incluyen, entre otros, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como los derivados plásmidos PBR322 o pUC o el vector Bluescript (Stratagene). La inserción dentro del vector de clonación puede lograrse, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN a un vector de clonación que tiene terminaciones cohesivas complementarias. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (ligantes) sobre las terminaciones de ADN; estos ligantes ligados pueden comprender oligonucleótidos específicos sintetizados químicamente que codifican secuencias de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector escindido y el gen CXCR-4 se pueden modificar mediante colas homopoliméricas. Pueden introducirse moléculas recombinantes en células huésped a través de la transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que se generan muchas copias de la secuencia del gen.

En un método alternativo, el gen deseado se puede identificar y aislar después de la inserción en un vector de clonación adecuado según un método de secuenciación aleatoria. El enriquecimiento del gen deseado por fraccionamiento por tamaños, por ejemplo, se puede realizar antes de la inserción en el vector de clonación.

En realizaciones específicas, la transformación de las células huésped con moléculas de ADN recombinante que incorporan el gen CXCR-4 aislado, el ADNc, o la secuencia de ADN sintetizada permite la generación de múltiples copias del gen. Por tanto, el gen se puede obtener en grandes cantidades mediante el cultivo de transformantes, el aislamiento de las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, cuando es necesario, la recuperación del gen insertado del ADN recombinante aislado.

Las secuencias de CXCR-4 proporcionadas en la presente invención incluyen las secuencias de nucleótidos que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que las encontradas en la proteínas CXCR-4 nativas, y las secuencias de aminoácidos codificadas con una funcionalidad equivalente a la de los aminoácidos, tal y como se describe en la Sección 5.2.2 más adelante para los derivados CXCR-4 y sus análogos.

Las secuencias de CXCR-4 proporcionadas en la presente descripción incluyen aquellas que codifican mutantes de CXCR-4 que son expresadas constitutivamente.

### 5.2.2. EXPRESIÓN DEL GEN CXCR-4

La secuencia de nucleótidos que codifica una proteína CXCR-4 o un análogo o fragmento o cualquier otro derivado funcionalmente activo de la misma, pueden introducirse en un vector de expresión adecuado, a saber, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia que codifica la proteína insertada. Las señales de transcripción y traducción necesarias también pueden ser suministradas a través del gen CXCR-4 nativo y/o sus regiones flanqueantes. Pueden utilizarse una amplia variedad de sistemas huésped-vector para expresar la secuencia que codifica la proteína. Estos incluyen, entre otros, sistemas de células de mamíferos infectadas con un virus (por ejemplo, vaccinia virus, adenovirus, etc.), sistemas de células de insectos infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, plásmido de ADN, o cósmido de ADN. Los elementos de expresión de vectores varían en cuanto a su fuerza y su especificidad. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, se puede usar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados. En algunas realizaciones específicas, se expresa un gen CXCR-4 humano, o una secuencia que codifica una porción funcionalmente activa de CXCR-4 humano. En otra realización, se expresa un fragmento de CXCR-4 que comprende un dominio de la proteína CXCR-4.

Cualquiera de los métodos antes descritos puede ser utilizado para la inserción de los fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico que consista en las señales de control de la transcripción/traducción adecuadas y las secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante in vitro y técnicas sintéticas y recombinantes in vivo (recombinación genética). La expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento de la proteína o del péptido CXCR-4 puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que la proteína o el péptido CXCR-4 quede expresado en un huésped transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de una proteína CXCR-4 se puede controlar a través de cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. Entre los promotores que pueden ser utilizados para controlar la expresión de CXCR-4 cabe incluir, entre otros, la región promotora inicial de SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); vectores de expresión procariota tales como el promotor de la 3-lactamasa (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), o el promotor tac (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; vectores de expresión de plantas que comprenden la región promotora de la nopalina sintasa (Herrera-Estrella et al., 1983, Nature 303:209-213) o el promotor ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bífosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); los elementos promotores procedentes de levaduras o de otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de la fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcional de animales, que presentan especificidad tisular y que se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen I de la elastasa que es activa en las células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), la región de control del virus del tumor de mama de ratón que es activa en las células testiculares, de la mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), la región de control del gen de la beta-globina que es activa en las células mieloides (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en las células oligodendrocitos

del cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); la región de control del gen de la cadena-2 ligera de la miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314 :283-286), y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 214:1372-1378).

En una realización específica, se utiliza un vector que comprende un promotor enlazado a un ácido nucleico que codifica el CXCR-4, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen resistente a los antibióticos).

En una realización específica, una estructura de expresión se realiza subclonando una secuencia de codificación de CXCR-4 en el sitio de restricción EcoRI de cada uno de los tres vectores pGEX (vectores de expresión de la glutatión-S-transferasa; Smith and Johnson, 1988, Gene 7:31-40). Esto permite la expresión del producto proteico CXCR-4 del subclón en el marco de lectura correcto.

Los vectores de expresión que contienen insertos del gen CXCR-4 pueden ser identificados por tres métodos generales: (a) hibridación del ácido nucleico, (b) presencia o ausencia de funciones del gen "marcador" y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer método, la presencia de un gen CXCR-4 insertado en un vector de expresión puede detectarse por hibridación del ácido nucleico utilizando sondas que comprenden secuencias homólogas a un gen CXCR-4 insertado. En el segundo método, el sistema vector/huésped recombinante se puede identificar y seleccionar en base a la presencia o ausencia de ciertas funciones del gen "marcador" (por ejemplo, actividad de la timidina-quinasa, resistencia a los antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) causadas por la inserción de un gen CXCR-4 en el vector. Por ejemplo, si el gen CXCR-4 se inserta en la secuencia del gen marcador del vector, pueden identificarse los recombinantes que contienen el inserto CXCR-4 por la ausencia de la función del gen marcador. En el tercer método, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar ensayando el producto CXCR-4 expresado por el recombinante. Tales ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína CXCR-4 en sistemas de ensayo in vitro, por ejemplo, unión con un anticuerpo anti-CXCR-4, promoción de la proliferación celular.

Una vez identificada y aislada una molécula de ADN recombinante particular, se pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para propagarla. Una vez establecidos el sistema huésped y las condiciones de crecimiento adecuadas, pueden propagarse y prepararse vectores de expresión recombinante en cantidad. Tal y como se ha explicado anteriormente, entre los vectores de expresión que pueden utilizarse cabe incluir, entre otros, los vectores de seguimiento o sus derivados: virus humanos o animales tales como vaccinia virus o adenovirus; virus de insectos tal como baculovirus; vectores de levaduras; vectores de bacteriófagos (por ejemplo, lambda), y vectores de plásmidos y cósmidos de ADN, por nombrar unos pocos.

Adicionalmente, puede elegirse una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. La expresión de ciertos promotores se puede elevar en presencia de ciertos inductores; de este modo se puede controlar la expresión de la proteína CXCR-4 obtenida por ingeniería genética. Además, diferentes células huéspedes tienen mecanismos característicos y específicos para el tratamiento y modificación de traducción y post-traducción (por ejemplo, glucosilación, fosforilación) de las proteínas. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huéspedes apropiados para asegurar la modificación y el tratamiento deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, puede utilizarse la expresión en un sistema bacteriano para producir un producto proteico de núcleo no glucosilado. La expresión en levaduras producirá un producto glucosilado. Puede utilizarse la expresión en células de mamíferos para asegurar la glucosilación "nativa" de una proteína heteróloga. Además, diferentes sistemas de expresión de vectores/huéspedes pueden efectuar reacciones de tratamiento de diferente alcance.

En otras realizaciones específicas, la proteína CXCR-4, y el fragmento, análogo, o derivado de la misma pueden expresarse como un producto proteico de fusión, o quimérico (que comprende la proteína, el fragmento, el análogo o el derivado unidos por medio de un enlace peptídico a una secuencia de proteínas heterólogas (de una proteína diferente). Tal producto quimérico puede prepararse ligando las secuencias de ácidos nucleicos apropiadas que codifican las secuencias de aminoácidos deseadas entre sí mediante métodos conocidos en la técnica, en el marco de codificación adecuado, y expresando el producto quimérico mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica. Alternativamente, tal producto quimérico puede prepararse mediante técnicas sintéticas de proteínas, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos.

Tanto la secuencia de ADNc como la genómica se pueden clonar y expresar.

### 5.2.3. IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS CXCR-4

En algunos aspectos particulares, en la descripción se presentan secuencias de aminoácidos de CXCR-4, preferentemente CXCR-4 humano, y sus fragmentos y derivados que comprenden un determinante antigénico 30 (a saber, pueden ser reconocidos por un anticuerpo) o que son de cualquier otro modo funcionalmente activos, además de secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anteriores. Tal como se utiliza aquí dentro, material CXCR-4 "funcionalmente activo" se refiere a un material que muestra una o más actividades funcionales asociadas a una

proteína CXCR-4 de longitud completa (proteína salvaje), por ejemplo, promoción de la proliferación celular, unión a un sustrato CXCR-4 o ligando de unión de CXCR-4, antigenicidad (unión a un anticuerpo anti-CXCR-4), inmunogenoicidad, etc.

En otra realización específica, en la descripción se presentan fragmentos de una proteína CXCR-4 que contienen 6 aminoácidos por lo menos, 10 aminoácidos, 50 aminoácidos, o al menos 75 aminoácidos. En otra realización, en la descripción se presentan proteínas que comprenden, tienen o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos 100% idéntica a la ID SEC N°: ID SEC N°: o ID SEC N°: , o cualquier combinación de las anteriores, de una proteína CXCR-4. Los fragmentos o proteínas que comprenden dichas secuencias son especialmente útiles para ser utilizados en inmunoterapia tal y como se describe más abajo. También se presentan fragmentos, o proteínas que comprenden fragmentos, a los que les falta alguna o todas las regiones de una proteína CXCR-4 antedichas. Se presentan ácidos nucleicos que codifican los anteriores.

Una vez identificado un recombinante que expresa las secuencias del gen *CXCR-4*, puede analizarse el producto génico. Esto se consigue mediante ensayos basados en las propiedades físicas o funcionales del producto, incluido el etiquetado radioactivo del producto seguido de un análisis por electroforesis en gel, inmunoensayo, etc.

Una vez identificada la proteína CXCR-4, se puede aislar y purificar por métodos estándar entre los que cabe incluir una cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, y cromatografía de exclusión por tamaños en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar de purificación de proteínas. Las propiedades funcionales se pueden evaluar a través de cualquier ensayo apropiado (véase la Sección 5.3).

Alternativamente, una vez identificada una proteína CXCR-4 producida a partir de un recombinante, puede deducirse la secuencia de aminoácidos de la proteína a partir de la secuencia de nucleótidos del gen quimérico contenido en el recombinante. Como resultado, la proteína se puede sintetizar a través de métodos químicos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Hunkapiller, M., et al., 1984, Nature 310:105-111).

En otra realización alternativa, las proteínas CXCR-4 nativas se pueden purificar a partir de fuentes naturales, a través de métodos estándar tales como los descritos arriba (por ejemplo, purificación por inmutafinidad).

En una realización específica de la presente descripción, tales proteínas CXCR-4, ya se hayan producido a través de técnicas de ADN recombinante o de métodos químicos sintéticos o por purificación de las proteínas nativas, incluyen, pero sin limitarse a las que contienen, como secuencia de aminoácidos primaria, toda o parte de la secuencia de aminoácidos sustancialmente, además de fragmentos y otros derivados, y análogos de los mismos como se muestra en la Figura 14 (ID SEC N°:) incluyendo proteínas homólogas a los mismos.

#### 5.2.4. ANTICUERPOS Y CÉLULAS INMUNES AL CXCR-4

##### 5.2.4.1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS CXCR-4 Y DERIVADOS DE LAS MISMAS

Según la descripción, la proteína CXCR-4, sus fragmentos u otros derivados, o análogos de los mismos, pueden utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen específicamente a dicho inmunógeno. Tales anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, Fab y una librería de expresión Fab. En una realización específica de la invención, se producen anticuerpos frente a una proteína CXCR-4 humana. En otra realización, se producen anticuerpos frente a un dominio de una proteína CXCR-4. En una realización específica, se utilizan fragmentos de una proteína CXCR-4 identificada como hidrófila como inmunógenos para la producción de anticuerpos. En una realización de la descripción, la proteína SDF-1, sus fragmentos u otros derivados, o análogos de los mismos, pueden utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen específicamente a dicho inmunógeno. En una realización específica de la descripción, se producen anticuerpos anti-SDF $\beta$ -1.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo contra una proteína CXCR-4 humana es un anticuerpo biespecífico (véase en líneas generales, por ejemplo, Fanger and Drakeman, 1995, Drug News and Perspectives 8z\_ 133-137). Dicho anticuerpo biespecífico se obtiene por ingeniería genética para que sea capaz de reconocer tanto (1) un epítopo de CXCR-4 humano y (2) una de entre una variedad de moléculas de "activación", por ejemplo, receptores Fc en células mieloides, y CD3 y CD2 en células T, que han sido identificados como capaces de causar una célula T citotóxica para destruir un blanco particular. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden prepararse bien mediante la conjugación química, hibridoma, o técnicas de biología molecular recombinantes conocidas por aquellos versados en la materia.

Pueden utilizarse varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales contra una proteína CXCR-4 o su derivado o análogo de los mismos. En una realización particular pueden obtenerse anticuerpos policlonales de conejo frente a un epítopo de una proteína CXCR-4, o una subsecuencia de los mismos. Para la producción del anticuerpo, se pueden inmunizar varios animales huéspedes por inyección con la proteína CXCR-4 nativa, o con una versión sintética, o derivado (por ejemplo, fragmento), incluidos, entre otros, conejos, ratones, ratas, etc. Pueden utilizarse diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, incluidos, entre otros Freund's (completo e incompleto), geles minerales tales como

hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa boca llave, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *corynebacterium parvum*.

- 5 Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos a la secuencia de la proteína CXCR-4, o análogo a la misma, puede utilizarse cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpos a través de líneas celulares continuas en cultivos. Por ejemplo, la técnica del hibridoma, desarrollada originalmente por Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256 -495-497), así como la técnica del trioma, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica del EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). En una realización adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes haciendo uso de la tecnología descrita en la PCT/US90/02545. Según la invención, pueden utilizarse anticuerpos humanos y pueden obtenerse utilizando hibridomas humanos (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030) o transformando células T humanas con virus EBV in vitro (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96). De hecho, según la invención, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.* 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) a base de unir los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica al CXCR-4 con los genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica adecuada. Dichos anticuerpos se encuentran dentro del alcance de esta descripción.
- 10
- 15
- 20 Según la descripción, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (Patente Estadounidense 4.946.778) pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de cadena simple específicos al CXCR-4. En una realización adicional de la invención se hace uso de las técnicas descritas para la construcción de librerías de expresión de Fab (Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para las proteínas CXCR-4, derivados o análogos.
- 25 Pueden generarse mediante técnicas conocidas fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la molécula. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, entre otros: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que puede producirse por la digestión con pepsina de la molécula del anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula del anticuerpo con papaína y un agente reductor, y fragmentos Fv.
- 30 Durante la producción de los anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede conseguirse a través de técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos capaces de reconocer un dominio específico de una proteína CXCR-4, se pueden ensayar los hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de CXCR-4 que contiene dicho dominio. Al seleccionar un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo CXCR-4 pero que no se une específicamente a un homólogo CXCR-4 diferente, la selección debe realizarse en base a la unión positiva al primer homólogo CXCR-4 y a una falta de unión al segundo homólogo CXCR-4.
- 35

También se presentan anticuerpos específicos a un dominio de una proteína CXCR-4.

- 40 Los anticuerpos antedichos puede utilizarse en métodos conocidos en la técnica relativos a la localización de las secuencias de la proteína CXCR-4 de la invención, por ejemplo, para la formación de imágenes de estas proteínas, la medición de los niveles de las mismas en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico, etc.

En otra realización de la descripción (véase más adelante), los anticuerpos anti-CXCR-4 y los fragmentos de los mismos que contiene el dominio de unión son Terapéuticos.

- 45 Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos de los anticuerpos también se pueden conjugar con una proteína o péptido heterólogos mediante la tecnología de conjugación química o de ADN recombinante. La proteína quimérica resultante posee la especificidad de unión a antígenos del anticuerpo y la función de la proteína heteróloga. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica la región de unión del antígeno de un anticuerpo específico al dominio extracelular de CXCR-4 se puede fusionar genéticamente a una secuencia de codificación de la cadena zeta del receptor de células T. Tras la expresión de esta estructura en células T, las células T se expanden ex vivo y se administran por infusión a un paciente con cáncer cerebral. Las células T que expresan esta proteína quimérica están específicamente concebidas para tumores que expresan el CXCR-4 como resultado de la especificidad de unión del anticuerpo y causan la muerte de las células tumorales. Alternativamente, se fusiona un anticuerpo a una proteína que induce la migración de leucocitos o tiene afinidad para atraer otros compuestos a un sitio tumoral. Como proteína específica de este tipo es la estreptavidina. A la unión de un anticuerpo conjugado de la estreptavidina a una célula tumoral le puede seguir la adición de un fármaco, toxina o radioisótopo biotinilados para causar la muerte específica de tumor.
- 50
- 55

Pueden prepararse kits para su uso en tales métodos de localización y terapia de tumores in vitro que contengan los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos) conjugados a cualquiera de los tipos de sustancias antedichos. Los componentes de los kits pueden envasarse bien en un medio acuoso o en forma liofilizada. Cuando

los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos) se utilizan en los kits a modo de conjugados en los que se adhiere una etiqueta o una fracción terapéutica, tal como un ión metálico radiactivo o una fracción de un fármaco terapéutico, los componentes de tales conjugados pueden suministrarse bien en forma de totalmente conjugada, en forma de intermedios o como fracciones separadas a conjugar por el usuario del kit.

#### 5 5.2.5. PROTEÍNAS CXCR-4, DERIVADOS Y ANÁLOGOS

La descripción también se refiere a composiciones que contienen proteínas CXCR-4, y derivados (incluidos, entre otros, fragmentos) y análogos de proteínas CXCR-4, en particular aquellos derivados que actúan como antagonistas de la actividad de CXCR-4. En la invención también se presentan ácidos nucleicos que codifican derivados de la proteína CXCR-4 y análogos de la proteína. En una realización, las proteínas CXCR-4 son codificadas por los ácidos nucleicos de CXCR-4 descritos en la sección 5.2.1. de arriba. En aspectos particulares, las proteínas, derivados o análogos son de proteínas CXCR-4 de animales, por ejemplo, mosca, rana, ratón, rata, cerdo, vaca, perro, mono, de seres humanos o de plantas.

La producción y el uso de derivados y análogos relativos al CXCR-4 se encuentran dentro del alcance de la presente descripción. En una realización específica, el derivado o análogo es funcionalmente activo, a saber, capaz de exhibir una o más actividades funcionales asociadas a una proteína CXCR-4 de longitud total, tipo salvaje. Como ejemplo, tales derivados o análogos que tienen la inmunógenoicidad o antigenicidad deseadas pueden ser utilizados, por ejemplo, en inmunoensayos, inmunizaciones, inhibición de la actividad de CXCR-4, etc. Los derivados o análogos que retienen, o alternativamente les falta o inhiben, una propiedad deseada de CXCR-4 de interés (por ejemplo, unión a un ligando de unión de CXCR-4, promoción de una proliferación celular), pueden ser utilizados como inductores, o inhibidores, respectivamente, de tal propiedad y sus correlatos fisiológicos. Una realización específica se refiere a un fragmento de CXCR-4 que puede ser unido a través de un anticuerpo anti-CXCR-4. Los derivados o análogos de CXCR-4 se pueden ensayar para comprobar si poseen la actividad deseada a través de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, los ensayos descritos en las Secciones 5.3 y 5.5.

En particular, los derivados CXCR-4 se pueden crear alterando secuencias de CXCR-4 mediante sustituciones, adiciones o deleciones con las que se obtienen moléculas con una funcionalidad equivalente. Dada la degeneración de las secuencias de codificación de nucleótidos, en la práctica de la presente invención pueden utilizarse otras secuencias de ADN que sustancialmente codifican la misma secuencia de aminoácidos que un gen CXCR-4. Éstas incluyen, entre otras, secuencias de nucleótidos que comprenden todos los genes CXCR-4 o porciones de ellos que son alterados por la sustitución de distintos codones que codifican un residuo de aminoácido funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Asimismo, los derivados CXCR-4 de la invención incluyen, entre otros, aquellos que contienen, como secuencia primaria de aminoácidos, toda la secuencia de aminoácidos, o parte de ella, de una proteína CXCR-4 incluidas las secuencias alteradas en las que los residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes son sustituidos por residuos dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Por ejemplo, pueden sustituirse uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia por otro aminoácido de polaridad similar que actúa como equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustitutos para los aminoácidos presentes dentro de la secuencia se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

En una realización específica de la descripción, se presentan las proteínas que consisten en o comprenden un fragmento de una proteína CXCR-4 que consiste en 10 aminoácidos (continuos) como mínimo. En otras realizaciones, el fragmento consiste en 20 ó 50 aminoácidos de la proteína CXCR-4 como mínimo. En realizaciones específicas, dichos fragmentos tienen más de 35, 100 ó 200 aminoácidos. Los derivados o análogos de CXCR-4 incluyen, entre otros, aquellas moléculas que comprenden regiones sustancialmente homólogas al CXCR-4 o fragmentos de las mismas (por ejemplo, en varias realizaciones, al menos una identidad del 60% o 70% u 80% o 90% o 95% como mínimo respecto a una secuencia de aminoácidos de igual tamaño o en comparación con una secuencia alineada en donde la alineación se realiza mediante un programa informático de homología conocido en la técnica) o cuyo ácido nucleico codificador es capaz de hibridarse con una secuencia de CXCR-4 de codificación bajo condiciones de rigurosidad, rigurosidad moderada o sin rigurosidad.

Los derivados CXCR-4 y sus análogos de la descripción pueden producirse mediante varios métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que llevan a su producción pueden ocurrir a nivel de gen o proteína. Por ejemplo, la secuencia del gen CXCR-4 clonado puede modificarse mediante cualquiera de numerosas estrategias conocidas en la técnica (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). La secuencia se puede escindir en sitios apropiados con una o más endonucleasas de restricción, seguido de una modificación enzimática adicional y, si se desea aislar y ligar in vitro. Durante la producción del gen que codifica un derivado CXCR-4 o su análogo, debe procurarse garantizar que el gen modificado permanece dentro del mismo marco de lectura de traducción que el CXCR-4, sin interrumpirse por señales de parada de la traducción, en la región del gen en la que se codifica la actividad deseada de CXCR-4.

Además, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el CXCR-4 se puede mutar *in vitro* o *in vivo*, para crear y/o destruir secuencias de traducción, iniciación y/o terminación, o para crear variaciones en las regiones codificadoras y/o formar nuevos sitios para las endonucleasas de restricción o destruir los ya existentes, para facilitar una modificación adicional *in vitro*. Puede usarse cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica, incluidas, entre otros, la mutagénesis química, la mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson, C, et al., 1978, J. Biol. Chem 253:6551), uso de enlazadores TAB® (Pharmacia), etc.

Las manipulaciones de la secuencia de CXCR-4 también pueden realizarse a nivel proteico. Dentro del alcance de la descripción están incluidos los fragmentos de la proteína CXCR-4 u otros derivados o análogos, que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas que incluyen, entre otras, la escisión química específica por bromuro cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH<sub>4</sub>; acetilación, formilación, oxidación, síntesis de reducción metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

Adicionalmente, los análogos y derivados de CXCR-4 se pueden sintetizar químicamente. Por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos se puede sintetizar un péptido que corresponda a una porción de una proteína CXCR-4 que comprende el dominio deseado, o que media la actividad deseada *in vitro*. Además, si se desea, en la secuencia de CXCR-4 se pueden introducir aminoácidos no clásicos o análogos de aminoácidos químicos a modo de sustitución o adición. Los aminoácidos no clásicos incluyen, entre otros, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α-aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ-Abu, ε-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, 3-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos diseñadores tales como los β-metil-aminoácidos, α-metil-aminoácidos, y Na-metil-aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrorrotatorio) o L (levorrotatorio).

En una realización específica de la descripción, el derivado CXCR-4 es una proteína quimérica, o de fusión, que comprende una proteína CXCR-4 o un fragmento de la misma (que preferentemente consiste en al menos un dominio o motivo de la proteína CXCR-4, o al menos 10 aminoácidos de la proteína CXCR-4) unida por su terminal amino o carboxi, a través de una unión peptídica, a una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente. En una realización, dicha proteína quimérica se produce por medio de la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica la proteína (que comprende una secuencia de codificación de CXCR-4 unida en el marco a una secuencia de codificación de una proteína diferente). Tal producto quimérico puede hacerse ligando las secuencias de ácidos nucleicos apropiados que codifican las secuencias de aminoácidos deseadas entre sí mediante métodos conocidos en la técnica, en el marco de codificación adecuado, y expresando el producto quimérico mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica. Alternativamente, tal producto quimérico puede hacerse mediante técnicas sintéticas de proteínas, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos. Pueden construirse genes quiméricos que comprenden porciones CXCR-4 fusionadas a cualquiera de las secuencias de codificación de proteínas heterólogas. Una realización específica se refiere a una proteína quimérica que comprende un fragmento de CXCR-4 de seis aminoácidos por lo menos.

En otra realización específica, el derivado CXCR-4 es una molécula que comprende una región de homología con una proteína CXCR-4. A modo de ejemplo, en varias realizaciones, una primera región de la proteína puede ser considerada "homóloga" a una segunda región de la proteína cuando la secuencia de aminoácidos de la primera región es idéntica en un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% por lo menos, en comparación con cualquier secuencia de la segunda región con un número de aminoácidos igual al número contenido en la primera región o en comparación a una secuencia alineada de la segunda región que ha sido alineada a través de un programa de homología informático conocido en la técnica. Por ejemplo, una molécula puede comprender una o más regiones homólogas a un dominio CXCR-4 o a una porción del mismo.

En las subsecciones siguientes y en las secciones de ejemplos que se encuentran más adelante, se describen otras realizaciones específicas de los derivados y análogos.

### 5.3. ENSAYOS DE PROTEÍNAS CXCR-4, SUS DERIVADOS Y ANÁLOGOS

La actividad funcional de las proteínas CXCR-4, sus derivados y análogos, se puede ensayar mediante distintos métodos.

Por ejemplo, en una realización de la descripción, donde se está ensayando la capacidad de unirse o competir con un CXCR-4 de tipo salvaje para unirse a un anticuerpo anti-CXCR-4, pueden utilizarse varios inmunoensayos conocidos en la técnica incluidos, entre otros, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos en los que se hace uso de técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, enzimas o etiquetas radioisotópicas, por ejemplo), Western blots, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel,

ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteínas A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión del anticuerpo se detecta observando una marca en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una realización más, el anticuerpo secundario se etiqueta. Se conocen muchos medios 30 en la técnica para detectar las uniones en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención.

En otra realización, en la que se identifica una proteína de unión de CXCR-4, la unión se puede ensayar, por ejemplo, a través de medios bien conocidos en la técnica. En otra realización, se pueden ensayar correlatos fisiológicos de CXCR-4 que se unen a sus sustratos (transducción de señales).

- 10 Además, en la Sección 5.4 se describen ensayos que pueden ser utilizados para detectar o medir la capacidad de inhibir o, alternativamente, promover, una proliferación celular.

Otros métodos serán conocidos por aquellos versados en la materia y se encuentran dentro del alcance de la descripción.

#### 5.4. DIAGNOSIS Y CRIBADO

- 15 Las proteínas CXCR-4, los análogos, derivados y subsecuencias de las mismas, los ácidos nucleicos de CXCR-4 (y secuencias complementarias a los mismos) y los anticuerpos anti-CXCR-4, pueden ser utilizados en diagnósticos. Tales moléculas pueden ser utilizadas en ensayos tales como inmunoensayos, para detectar, pronosticar, diagnosticar o verificar distintos estados, enfermedades y trastornos que afectan a la expresión de CXCR-4, o verificar el tratamiento de los mismos. En particular, tal inmunoensayo se lleva a cabo mediante un método que  
20 consiste en poner en contacto una muestra derivada de un paciente con un anticuerpo anti-CXCR-4 en condiciones tales que pueda tener lugar la unión inmuno-específica, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica por parte del anticuerpo. En un aspecto específico, tal unión del anticuerpo, en secciones tisulares, puede ser utilizada para detectar una localización aberrante de CXCR-4 o niveles aberrantes de CXCR-4 (p. ej. alto, bajo o ausente). En una realización específica, el anticuerpo contra el CXCR-4 puede utilizarse para ensayar en el  
25 tejido de un paciente o en una muestra de suero para la presencia de CXCR-4 donde un nivel aberrante de CXCR-4 indicaría un estado de enfermedad. Por "niveles aberrantes" se entiende unos niveles aumentados o reducidos respecto al actual, o un nivel estándar que representa al actual, en una muestra análoga de una porción del cuerpo o de un sujeto que no padece el trastorno. En una realización específica, puede utilizarse un anticuerpo contra el CXCR-4 para ensayar y cribar tejidos o fluidos corporales incluidos, entre otros, líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral ante unos niveles de expresión de CXCR-4 elevados, indicativos de un tumor.

- Los inmunoensayos que pueden utilizarse incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que hacen uso de técnicas tales como Western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos,  
35 inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de la proteína A, por nombrar unos pocos.

- Los genes CXCR-4 y las secuencias de ácidos nucleicos relacionadas y subsecuencias, incluidas secuencias complementarias, también puede utilizarse en ensayos de hibridación. Las secuencias de ácidos nucleicos de CXCR-4, o las subsecuencias de las mismas que comprenden al menos 8 nucleótidos, pueden utilizarse como sondas de hibridación. Pueden utilizarse ensayos de hibridación para detectar, pronosticar, diagnosticar o verificar  
40 condiciones, trastornos o enfermedades asociados con cambios aberrantes en la expresión y/o actividad de CXCR-4. En particular, tal ensayo de hibridación se lleva a cabo mediante un método que consiste en poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con el ADN o el ARN de CXCR-4, en condiciones tales que pueda producirse la hibridación, y detectar o medir cualquier hibridación resultante.

- 45 En realizaciones específicas, pueden diagnosticarse enfermedades o trastornos relacionados con una sobreproliferación de células, o se puede cribar su presunta presencia, o se puede detectar una predisposición a desarrollar tales trastornos, detectando unos niveles aumentados de proteína CXCR-4, ARN CXCR-4, o actividad funcional de CXCR-4 o detectando mutaciones en el ARN, ADN o proteína de CXCR-4 (por ejemplo, translocaciones en los ácidos nucleicos CXCR-4, truncaciones en el gen o la proteína CXCR-4, cambios en las secuencias de  
50 nucleótidos o aminoácidos relativos a un CXCR-4 de tipo salvaje) que pueden causar una expresión o actividad de CXCR-4 aumentadas. Entre dichas enfermedades y trastornos cabe incluir, entre otros, los tipos de tumores o de tejidos mencionados en la Sección 6 en los que el CXCR-4 está sobreexpresado. A modo de ejemplo, los niveles de proteína CXCR-4 pueden detectarse mediante un inmunoensayo, los niveles de ARN CXCR-4 pueden detectarse mediante ensayos de hibridación (por ejemplo, Northern blots, hibridaciones en mancha), las translocaciones y mutaciones puntuales en los ácidos nucleicos CXCR-4 pueden detectarse mediante Southern blot, análisis RFLP,  
55 PCR utilizando cebadores que preferentemente generan un fragmento que abarca al menos la mayor parte del gen CXCR-4, secuenciación del ADN genómico o del ADNc de CXCR-4 obtenido del paciente, etc.

En una realización preferente, se detectan o se miden los niveles de ARNm o de proteína de CXCR-4 en una muestra del paciente, en donde unos valores aumentados indican que el sujeto tiene, o presenta una predisposición a desarrollar un tumor maligno o un trastorno hiperproliferativo; en donde los niveles aumentados se consideran respecto a los niveles presentes en una muestra análoga de una porción del cuerpo de un sujeto que no tiene el tumor maligno o trastorno hiperproliferativo según el caso.

En otra realización específica, se diagnostican enfermedades o trastornos relacionados con una deficiencia en la proliferación de células o en que la proliferación de células es deseable para el tratamiento, o se puede cribar su presunta presencia, o se puede detectar una predisposición a desarrollar tales trastornos, detectando unos niveles reducidos de proteína CXCR-4, ARN CXCR-4, o actividad funcional de CXCR-4 o detectando mutaciones en el ARN, ADN o proteína de CXCR-4 (por ejemplo, translocaciones en los ácidos nucleicos CXCR-4, truncaciones en el gen o la proteína, cambios en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos relativos a un CXCR-4 de tipo salvaje, que pueden causar una expresión o actividad reducida de CXCR-4. Entre dichas enfermedades y trastornos cabe incluir, entre otros, los tipos de tumores y de tejidos mencionados en la Sección 6 y sus subsecciones en los que el CXCR-4 está sobreexpresado. Por ejemplo, pueden determinarse los niveles de proteína CXCR-4, los niveles de ARN CXCR-4, la actividad de unión de CXCR-4 y la presencia de las traslocaciones o mutaciones puntuales, tal y como se ha descrito anteriormente.

En una realización específica, se detectan o se miden los niveles de ARNm o de proteína de CXCR-4 en una muestra del paciente, en donde unos valores disminuidos indican que el sujeto tiene, o presenta una predisposición a desarrollar un tumor maligno o un trastorno hiperproliferativo; en donde los niveles disminuidos se consideran respecto a los niveles presentes en una muestra análoga de una porción del cuerpo de un sujeto que no tiene ningún tumor maligno ni ningún trastorno hiperproliferativo según el caso.

En la descripción también se presentan kits para su uso en diagnósticos que comprenden, en uno o más contenedores, un anticuerpo anti-CXCR-4 y, opcionalmente, un ligando etiquetado de unión al anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo anti-CXCR-4 puede estar etiquetado (con un marcador detectable, por ejemplo, una fracción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente o radioactiva). También se presenta un kit que comprende, en uno o más contenedores, una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con el ARN CXCR-4. En una realización específica, un kit puede comprender, en uno o más contenedores, un par de cebadores (por ejemplo, cada uno de ellos en el rango de tamaño de 6-30 nucleótidos) capaces de cebar la amplificación (por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), reacción en cadena de la ligasa (véase EP 320.308), uso de replicasa Q $\phi$ 3, reacción de sonda cíclica, u otros métodos conocidos en la técnica) bajo las condiciones de reacción apropiadas de al menos una porción de un ácido nucleico CXCR-4. Opcionalmente, el kit también puede comprender, en un contenedor, una cantidad predeterminada de una proteína o ácido nucleico de CXCR-4 purificados, por ejemplo, para el uso como patrón o control.

## 5.5. USOS TERAPÉUTICOS

En la invención se presenta un compuesto terapéutico (denominado "Terapéutico" en el presente documento) para el uso en el tratamiento o prevención de varias enfermedades y trastornos mediante la administración del Terapéutico. Tales "Terapéuticos" son anticuerpos contra el CXCR-4 (como ya se ha descrito anteriormente); ácidos nucleicos que codifican las proteínas CXCR-4, los análogos, o derivados de las mismas (por ejemplo, como los descritos más arriba en el presente documento) y ácidos nucleicos antisentido CXCR-4. Los trastornos asociados a una tumorigénesis o una sobreproliferación celular se tratan o previenen mediante la administración de un Terapéutico capaz de antagonizar la función de CXCR-4. Los trastornos en los que la proliferación celular es deficiente o deseada se tratan o previenen mediante la administración de un Terapéutico capaz de promover la función de CXCR-4. Véanse los detalles en las subsecciones siguientes.

En líneas generales, es preferible administrar un producto con un origen de la especie o una reactividad de la especie (en el caso de los anticuerpos) iguales a las del receptor. Así, en una realización preferente, a un paciente humano se le administra terapéutica o profilácticamente una proteína CXCR-4 humana, un derivado, o análogo, o ácido nucleico de la misma, o un anticuerpo contra una proteína CXCR-4 humana.

En las Secciones de la 5.1 a la 5.7 del presente documento se incluyen descripciones adicionales y fuentes de Terapéuticos que pueden ser utilizadas de conformidad con la invención.

### 5.5.1. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE TRASTORNOS ASOCIADOS A LA SOBREPROLIFERACIÓN DE CÉLULAS

Las enfermedades y trastornos asociados a una sobreproliferación celular se tratan o previenen mediante la administración de un Terapéutico capaz de antagonizar (a saber, inhibir) la función de CXCR-4. Ejemplos de tal Terapéutico incluyen, entre otros, anticuerpos contra el CXCR-4, ácidos nucleicos antisentido CXCR-4, derivados o análogos que son funcionalmente activos, siendo particularmente activos en la inhibición de la proliferación celular (por ejemplo, como ha quedado demostrado en ensayos in vitro o en modelos animales o en Drosophila). Se pueden

identificar otros Terapéuticos a utilizar, por ejemplo, antagonistas CXCR-4, mediante ensayos in vitro o modelos animales, ejemplos de los cuales se describen más adelante.

En realizaciones específicas, los Terapéuticos que inhiben la función de CXCR-4 se administran terapéuticamente (y también profilácticamente): (1) ante enfermedades o trastornos asociados a un nivel aumentado (respecto al normal o deseado) de proteína o función de CXCR-4, por ejemplo, en pacientes en los que la proteína CXCR-4 está sobreexpresada, genéticamente defectuosa, o es biológicamente hiperactiva; o (2) ante enfermedades o trastornos en donde ensayos in vitro (o in vivo) (véase más adelante) indican la utilidad de la administración de un antagonista CXCR-4. El nivel aumentado de proteína o de la función de CXCR-4 puede detectarse fácilmente, por ejemplo, obteniendo una muestra de tejido de un paciente (por ejemplo, de un tejido de biopsia) y ensayándola in vitro para obtener los niveles de ARN o de proteína, la estructura y/o actividad del ARN o proteína de CXCR-4 expresados. Por lo tanto, pueden utilizarse muchos métodos estándar en la técnica, incluidos, entre otros, inmunoensayos para detectar y/o visualizar proteínas CXCR-4 (por ejemplo, Western blot, inmunoprecipitación seguido de electrofóresis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de CXCR-4 a base de detectar y/o visualizar el mRNA CXCR-4 (por ejemplo, ensayos Northern, hibridaciones en mancha, hibridación in situ, etc.), etc.

Entre las enfermedades y trastornos asociados a la sobreproliferación celular que pueden ser tratadas o prevenidas cabe incluir, entre otras, tumores malignos, condiciones premalignas (por ejemplo, hiperplasia, metaplasia, displasia), tumores benignos, trastornos hiperproliferativos, trastornos disproliferativos benignos, etc. Ejemplos de estos se detallan más abajo.

#### 5.5.1.1. TUMORES MALIGNOS

Entre los tumores malignos y los trastornos relacionados que pueden ser tratados o prevenidos mediante la administración de un Terapéutico capaz de inhibir la función de CXCR-4 cabe incluir, entre otros, los listados en la Tabla 1 (para una reseña de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia).

#### TABLA 1

#### TUMORES MALIGNOS Y TRASTORNOS RELACIONADOS

##### Leucemia

##### leucemia aguda

##### leucemia linfocítica aguda

##### leucemia linfoblástica aguda

##### leucemia mielocítica aguda

##### mieloblástica

##### mielógena

##### promielocítica

##### mielomonocítica

##### monocítica

##### eritroleucemia

##### leucemia crónica

##### leucemia mielocítica crónica (granulocítica)

##### leucemia mielógena crónica

##### leucemia linfocítica crónica

##### Policitemia vera

##### Linfoma

##### enfermedad de Hodgkin

##### enfermedad no-Hodgkin

Mieloma múltiple

Macroglobulinemia de Waldenström

Enfermedad de cadena pesada

Tumores sólidos

|    |                                          |
|----|------------------------------------------|
| 5  | sarcomas y carcinomas                    |
|    | adenocarcinoma                           |
|    | fibrosarcoma                             |
|    | mixosarcoma                              |
|    | liposarcoma                              |
| 10 | condrosarcoma                            |
|    | sarcoma osteogénico                      |
|    | cordoma                                  |
|    | angiosarcoma                             |
|    | endoteliosarcoma                         |
| 15 | linfangiosarcoma                         |
|    | linfangioendoteliosarcoma                |
|    | sinovioma                                |
|    | mesotelioma                              |
|    | tumor de Ewing                           |
| 20 | leiomiosarcoma                           |
|    | rabdomiosarcoma                          |
|    | carcinoma de colon                       |
|    | adenocarcinoma colorrectal               |
|    | tumor de colon metastásico en el cerebro |
| 25 | carcinoma pulmonar                       |
|    | cáncer de páncreas                       |
|    | cáncer de mama                           |
|    | cáncer de ovario                         |
|    | cáncer de próstata                       |
| 30 | carcinoma de células escamosas           |
|    | carcinoma de células basales             |
|    | adenocarcinoma                           |
|    | carcinoma de las glándulas sudoríparas   |
|    | carcinoma de las glándulas sebáceas      |
| 35 | carcinoma papilar                        |
|    | adenocarcinomas papilares                |

|    |                                         |
|----|-----------------------------------------|
|    | cistadenocarcinoma                      |
|    | carcinoma medular                       |
|    | carcinoma broncogénico                  |
|    | carcinoma de células renales            |
| 5  | hepatoma                                |
|    | carcinoma del conducto biliar           |
|    | coriocarcinoma                          |
|    | seminoma                                |
|    | carcinoma embrional                     |
| 10 | tumor de Wilms                          |
|    | cáncer de cérvix uterino                |
|    | cáncer uterino                          |
|    | tumor testicular                        |
|    | carcinoma de pulmón                     |
| 15 | carcinoma de pulmón de células pequeñas |
|    | carcinoma de vejiga                     |
|    | carcinoma epitelial                     |
|    | glioblastoma                            |
|    | glioma                                  |
| 20 | astrocitoma                             |
|    | meduloblastoma                          |
|    | craniofaringioma                        |
|    | ependimoma                              |
|    | pinealoma                               |
| 25 | hemangioblastoma                        |
|    | neuroma acústico                        |
|    | oligodendroglioma                       |
|    | meningioma                              |
|    | melanoma                                |
| 30 | neuroblastoma                           |
|    | retinoblastoma                          |

En realizaciones específicas, se tratan o previenen tumores malignos o cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, en el cerebro, mamas, colon, próstata, pulmón o piel. En otras realizaciones específicas, se trata o previene el carcinoma, el melanoma o la leucemia.

### 35 5.5.1.2. CONDICIONES PREMALIGNAS

Los Terapéuticos de la descripción que antagonizan la actividad de CXCR-4 también pueden ser administrados para tratar condiciones premalignas o para prevenir el avance a un estado neoplásico o maligno, incluidos, entre otros, los trastornos listados en la Tabla 1. Tal uso profiláctico o terapéutico está indicado en condiciones conocidas o en las que se sospecha que preceden el avance a una neoplasia o cáncer, sobre todo cuando no ha ocurrido ningún

crecimiento celular no neoplásico que consiste en hiperplasia, metaplasia o, más concretamente, displasia (para una reseña de tales condiciones de neoplasia, véase Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79.) La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que conlleva un aumento del número de células en un órgano o en un tejido sin que se produzca una alteración significativa en su estructura o función. Sólo a título de ejemplo, la hiperplasia endometrial normalmente precede al cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en el que un tipo de célula adulta o completamente diferenciada sustituye a otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede ocurrir en células del tejido conjuntivo o epitelial. La metaplasia atípica implica un epitelio metaplásico algo desordenado. La displasia suele ser un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada del crecimiento de células no neoplásicas, implicando la pérdida en la uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de las células. Las células displásicas suelen tener núcleos anormalmente grandes con hiper cromasia y exhiben pleomorfismo. La displasia ocurre típicamente donde existe irritación o inflamación crónicas, y a menudo se encuentra en el cérvix, vías respiratorias, cavidad oral y vesícula biliar.

Alternativamente o de forma adicional a la presencia de un crecimiento celular anormal caracterizado como hiperplasia, metaplasia o displasia, la presencia de una o más características de un fenotipo transformado, o de un fenotipo 20 maligno, visualizado in vivo o visualizado in vitro por medio de una muestra de células de un paciente, puede indicar la conveniencia de la administración profiláctica/terapéutica de un Terapéutico capaz de inhibir la función de CXCR-4. Como se ha mencionado antes, tales características de un fenotipo transformado incluyen cambios en la morfología, pérdida de la unión al sustrato, pérdida de inhibición de contacto, pérdida de la dependencia del anclaje, liberación de proteasas, aumento del transporte de azúcar, disminución del requerimiento de suero, expresión de antígenos fetales, desaparición de la proteína de la superficie celular de 250.000 Dalton, etc. (véanse también en id., at pp. 84-90 las características asociadas a un fenotipo transformado o maligno 30).

En una realización específica, la leucoplasia, una lesión hiperplásica o displásica del epitelio benigna, o la enfermedad de Bowen, un carcinoma in situ, son lesiones pre-neoplásicas indicativas de la conveniencia de una intervención profiláctica.

En otra realización, una enfermedad fibroquística (hiperplasia quística, displasia mamaria, en particular la adenosis (hiperplasia epitelial benigna)) es indicativa de la conveniencia de una intervención profiláctica.

En otras realizaciones, se trata de administrar una cantidad efectiva de un Terapéutico a un paciente que presenta uno o más de los siguientes factores de predisposición al tumor maligno: una translocación cromosómica asociada con un tumor maligno (por ejemplo, el cromosoma Philadelphia para la leucemia mielógena crónica, t(14;18) para el linfoma folicular, etc.), poliposis familiar o síndrome de Gardner (posibles precedentes del cáncer de colon), gammapatía monoclonal benigna (un posible precedente del mieloma múltiple), y un parentesco de primer grado con personas que tienen un cáncer o una enfermedad precancerosa y que presentan un modelo hereditario Mendeliano (genético) (por ejemplo, poliposis familiar de colon, síndrome de Gardner, exostosis hereditaria, adenomatosis polioendocrina, carcinoma tiroideo medular con producción amiloide y feocromocitoma, síndrome de Peutz-Jeghers, neurofibromatosis de Von Recklinghausen, retinoblastoma, tumor del cuerpo carotídeo, melanocarcinoma cutáneo, melanocarcinoma intraocular, xeroderma pigmentoso, ataxia-telangiectasia, síndrome de Chediak-Higashi, albinismo, anemia aplásica de Fanconi, y síndrome de Bloom; véase Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 112-113) etc.).

En otra realización específica, se administra un Terapéutico de la invención a un paciente humano para prevenir la progresión al cerebro, mama, colon, próstata, pulmón o piel. En otras realizaciones específicas, se trata o previene el carcinoma, el melanoma o la leucemia.

### 5.5.1.3. TERAPIA GÉNICA

En una realización específica, se administran ácidos nucleicos antisentido complementarios a una secuencia que codifica una proteína CXCR-4, o un derivado funcional de la misma, para inhibir la función de CXCR-4 a través de la terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En esta realización de la invención, el ácido nucleico antisentido media un efecto terapéutico al inhibir la transcripción y traducción de CXCR-4.

Según la presente descripción, pueden utilizarse cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica. Abajo se describen algunos métodos de ejemplo:

Para reseñas generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12.:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32.: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden ser utilizados se describen en Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

En una realización, el Terapéutico comprende un ácido nucleico CXCR-4 sentido o antisentido que forma parte de un vector de expresión que expresa una proteína CXCR-4 o un fragmento o una proteína quimérica de la misma en un huésped adecuado. En particular, dicho ácido nucleico tiene un promotor enlazado de forma operativa a la región de codificación de CXCR-4, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente específico para tejidos.

En una realización particular, se utiliza una molécula de ácido nucleico en donde las secuencias de codificación de CXCR-4 y cualquier otra secuencia deseada son flanqueadas por regiones que permiten una recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, favoreciendo así la expresión intracromosómica del ácido nucleico CXCR-4 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

La administración del ácido nucleico al paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente queda directamente expuesto al ácido nucleico o al vector portador del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman con el ácido nucleico *in vitro* y después son transplantadas al paciente. A estos dos enfoques se les denomina terapia génica *in vivo* o *ex vivo*, respectivamente.

En una realización específica, el ácido nucleico es administrado directamente *in vivo*, donde es expresado para producir el producto codificado. Esto puede lograrse a través de cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolo como parte de un vector de expresión del ácido nucleico adecuado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, por infección utilizando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase la Patente Estadounidense n° 4.980.286), o mediante la inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes, Biolistic, Dupont), o revistiéndolo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolo en unión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo en unión con un ligando sometido a una endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que pueden ser utilizados para que lleguen a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, puede formarse un complejo ácido nucleico-ligando en donde el ligando comprende un péptido viral fusogénico para perturbar el desarrollo de endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite una degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para la toma y expresión específicas de células a base de dirigir un receptor específico (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/06180 con fecha 16 abril de 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 con fecha 23 de diciembre de 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 con fecha 26 de noviembre de 1992 (Findeis et al.); W093/14188 con fecha 22 de julio de 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 con fecha 14 de octubre de 1993 (Young)). Alternativamente, el ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de la célula huésped para su expresión, a través de una recombinación homóloga (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

En una realización específica, se utiliza un vector viral que contiene el ácido nucleico CXCR-4. Por ejemplo, puede utilizarse un vector retroviral (véase Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales han sido modificados para eliminar secuencias retrovirales que no son necesarias para el encapsulado del genoma viral y su integración en el ADN de la célula huésped. El ácido nucleico CXCR-4 a utilizar en la terapia génica se clona en el vector lo que facilita la administración del gen al paciente. En Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302, puede encontrarse información más detallada sobre los vectores retrovirales ya que se describe el uso del vector retroviral para llevar el gen *mdrl* hasta las células madre hematopoyéticas para conseguir que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias en las que se ilustra el uso de vectores retrovirales en la terapia génica son: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otro de los tipos de vectores virales que pueden utilizarse en la terapia génica. Los adenovirus son medios especialmente adecuados para el suministro de genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de forma natural los epitelios respiratorios en los que provoca una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Los adenovirus tienen la ventaja de que son capaces de infectar células no divisibles. Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 presentó una reseña sobre una terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 demostró el uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes a los epitelios respiratorios de monos Rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapias génicas pueden verse en Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; and Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234.

También se ha propuesto el uso de Virus adeno-asociados (AAV) en terapias génicas (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300).

Otra aproximación a la terapia génica implica la transferencia de un gen a las células presentes en un cultivo tisular mediante métodos como la electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las

células se colocan entonces bajo selección para aislar las células que han sido tomadas y que expresan el gen transferido. Esas células son entonces administradas al paciente.

En esta realización, el ácido nucleico es introducido en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica, incluidos, entre otros, la transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contenga las secuencias del ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en el estado de la técnica para la introducción de genes extraños en las células (véase, por ejemplo, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92) y pueden ser utilizadas de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando no se interrumpan las funciones de desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe permitir la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula y, preferentemente, heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden ser administradas al paciente por varios métodos conocidos en el estado de la técnica. En una realización preferente, las células epiteliales se inyectan, por ejemplo, por vía subcutánea. En otra realización, las células recombinantes de la piel pueden ser aplicadas a modo de injerto cutáneo en el paciente. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, la células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto que se pretende alcanzar, del estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para su uso en una terapia génica comprenden cualquier tipo de célula deseado, disponible, entre las que cabe incluir, entre otras, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varias células madre o progenitoras, en particular, células madre o progenitoras hematopoyéticas como, por ejemplo, las obtenidas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferente, la célula utilizada en la terapia génica es autóloga al paciente.

En una realización en la que se utilizan células recombinantes para la terapia génica, en las células se introduce un ácido nucleico CXCR-4 de modo que pueda ser expresado por las células o su progenie y, a continuación, las células recombinantes son administradas in vivo para que tengan un efecto terapéutico. En una realización específica, se utilizan células madre o progenitoras. Según esta realización de la presente invención, cualquier célula madre y/o progenitora que pueda ser aislada y mantenida in vitro puede ser potencialmente utilizada. Dichas células madre incluyen, entre otras, células madre hematopoyéticas (HSC), células madre de tejidos epiteliales tales como la piel y el epitelio intestinal, células musculares embrionarias del corazón, células madre del hígado (Publicación PCT WO 94/08598, con fecha 28 de abril de 1994), y células madre neurales (Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985).

Las células madre epiteliales (ESC) o queratinocitos pueden obtenerse de tejidos tales como piel y los epitelio intestinal mediante técnicas conocidas (Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229). En el tejido epitelial estratificado como la piel, la renovación ocurre por la mitosis de las células madre dentro de la capa germinal, la capa más cercana a la lámina basal. Las células madre presentes dentro del epitelio intestinal proporcionan una velocidad de renovación rápida de este tejido. Las ESC o queratinocitos obtenidos de la piel o del epitelio de los intestinos de un paciente o donante pueden cultivarse en un cultivo tisular (Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771). Si las ESC son proporcionadas por un donante, también puede utilizarse un método para la supresión de la reactividad del huésped contra el injerto (por ejemplo, irradiación, administración de fármacos o anticuerpos para promover la inmunosupresión moderada).

Respecto a las células madre hematopoyéticas (HSC), en esta realización de la invención puede utilizarse cualquier técnica que permita el aislamiento, propagación y mantenimiento in vitro de las HSC. Las técnicas con las que puede conseguirse esto incluyen (a) el aislamiento y establecimiento de cultivos de HSC a partir de células de la médula ósea aisladas de un futuro huésped, o de un donante, o (b) el uso de cultivos de HSC de larga duración ya establecidos con anterioridad que pueden ser alogénicos o xenogénicos. Las HSC no autólogas se utilizan preferentemente junto con un método para la supresión de las reacciones inmunológicas tras el trasplante del futuro huésped/paciente. En una realización particular de la presente invención, las células humanas de la médula ósea pueden obtenerse de la cresta ilíaca posterior mediante la aspiración con una aguja (véase, por ejemplo, Kodo et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377-1384). En una realización preferente de la presente invención, las HSC pueden hacerse altamente enriquecidas o en una forma sustancialmente pura. Este enriquecimiento puede realizarse antes, durante o después de un cultivo de larga duración y mediante técnicas conocidas en la práctica. Los cultivos de larga duración de células de la médula ósea pueden establecerse y mantenerse mediante, por ejemplo, técnicas de cultivo de células Dexter modificadas (Dexter et al., 1977, J. Cell Physiol. 9\_1:335) o técnicas de cultivo Witlock-Witte (Witlock and Witte, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608-3612).

En una realización específica, el ácido nucleico a introducir para la terapia génica comprende un promotor inducible unido de forma operativa a la región de codificación, de modo que pueda controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción adecuado.

En la Sección 5.8.2.2.2 se describen métodos adicionales que pueden ser adaptados para su uso en la administración de un ácido nucleico que codifica una proteína CXCR-4 o un derivado funcional de la misma.

## 5.5.2. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE TRASTORNOS HIPERPROLIFERATIVOS Y DISPROLIFERATIVOS

Las enfermedades o trastornos en los que se produce un aumento de la proliferación celular (crecimiento) o en los que la proliferación celular no es deseable en modo alguno, se tratan o previenen mediante la administración de un Terapéutico que antagoniza (inhibe) la función de CXCR-4. Los Terapéuticos que pueden utilizarse incluyen, entre otros, anticuerpos anti-CXCR-4 (y fragmentos y derivados de los mismos que contienen la región de unión de los mismos), ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 y ácidos nucleicos CXCR-4 que son disfuncionales (por ejemplo, debido a una inserción heteróloga (secuencia distinta de la de CXCR-4) dentro de la secuencia de codificación de CXCR-4) que se utilizan para "noquear" la función de CXCR-4 endógeno mediante la recombinación análoga (véase, por ejemplo, Capecchi, 1989, Science 244 :1288-1292). En una realización específica de la invención, se utiliza un ácido nucleico que contiene una porción de un gen CXCR-4 en donde las secuencias de CXCR-4 flanquean (las dos son 5' y 3') la secuencia de un gen diferente, como antagonista CXCR-4 para promover la inactivación de CXCR-4 mediante la recombinación homóloga (véase también Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438). Pueden identificarse también otros Terapéuticos capaces de inhibir la función de CXCR-4 mediante el uso de ensayos in vitro apropiados conocidos, por ejemplo, basados en su capacidad de inhibir la unión de CXCR-4 a otra proteína o de inhibir cualquier función de CXCR-4 conocida, ensayados preferentemente in vitro o en cultivo celular, si bien también pueden emplearse otros ensayos genéticos en *Drosophila* u otras especies. Preferentemente se utilizan ensayos in vitro o in vivo convenientes para determinar el efecto de un Terapéutico específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado.

En realizaciones específicas, los Terapéuticos que inhiben la función de CXCR-4 se administran terapéuticamente (y también profilácticamente): (1) ante enfermedades o trastornos asociados a un nivel aumentado (respecto al normal o deseado) de proteína o función de CXCR-4, por ejemplo, en pacientes en los que la proteína CXCR-4 es hiperactiva o está sobreexpresada; o (2) ante enfermedades o trastornos en donde ensayos in vitro (o in vivo) (véase más adelante) indican la utilidad de la administración de un antagonista CXCR-4. Los niveles aumentados de proteína o de la función de CXCR-4 pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, cuantificando la proteína y/o ARN, obteniendo una muestra de un tejido de un paciente (por ejemplo, de un tejido de biopsia) y ensayándola in vitro para obtener los niveles de ARN o de proteína, la estructura y/o actividad del ARN o proteína de CXCR-4 expresados. Por lo tanto, pueden utilizarse muchos métodos estándar en la técnica, incluidos, entre otros, inmunoensayos para detectar y/o visualizar proteínas CXCR-4 (por ejemplo, Western blot, inmunoprecipitación seguido de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de CXCR-4 a base de detectar y/o visualizar respectivamente el mRNA CXCR-4 (por ejemplo, ensayos Northern, hibridaciones en mancha, hibridación in situ, etc.), etc.

En otras realizaciones pueden llevarse a cabo mutagénesis químicas, o una recombinación homóloga con un gen CXCR-4 inactivado por inserción (véase Capecchi, 1989, Science 244:1288-1292 y la Sección 5.14 *más adelante*) para reducir o destruir la función de CXCR-4 endógeno para reducir la proliferación celular. En las Secciones 5.8.2 a 5.8.2.1.2 de arriba se describen métodos, formas de administración y composiciones adecuadas que pueden ser utilizadas para inhibir la función de CXCR-4.

En una realización de la invención se utiliza un Terapéutico que inhibe la actividad de CXCR-4 para tratar o prevenir trastornos hiperproliferativos y disproliferativos benignos. Realizaciones específicas se refieren al tratamiento o prevención de cirrosis hepática (una condición en la que la cicatrización ha superado los procesos normales de regeneración del hígado), tratamiento de una formación queloide (cicatriz hipertrófica) (desfiguración de la piel en donde el proceso de cicatrización interfiere en la renovación normal), psoriasis (una condición común de la piel que se caracteriza por la proliferación excesiva de la piel y un retardo en la determinación correcta del destino de la célula), tumores benignos, condiciones fibroquísticas e hipertrofia de tejidos (por ejemplo, hiperplasia prostática).

### 5.5.2.1. REGULACIÓN ANTISENTIDO DE LA EXPRESIÓN DE CXCR-4

En una realización específica, la función de CXCR-4 se inhibe mediante el uso de ácidos nucleicos antisentido CXCR-4. En la presente invención se presenta el uso terapéutico o profiláctico de ácidos nucleicos de seis nucleótidos por lo menos que son antisentido a un gen o ADNc que codifica un CXCR-4 o una porción del mismo. Tal y como se utiliza aquí dentro, ácido nucleico "antisentido" CXCR-4 se refiere a un ácido nucleico capaz de hibridarse a una porción de un ARN CXCR-4 (preferentemente ARNm) en virtud de alguna complementariedad de la secuencia. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región de codificación y/ no codificación de un ARNm CXCR-4. Dichos ácidos nucleicos antisentido son útiles como Terapéuticos capaces de inhibir la función de CXCR-4, y pueden ser utilizados en el tratamiento o prevención de trastornos como los descritos anteriormente en la Sección 5.5.2 y sus subsecciones.

Los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden ser oligonucleótidos de cadena doble o simple, ARN o ADN o una modificación o derivado de los mismos, que pueden ser administrados directamente a una célula o que pueden ser producidos intracelularmente mediante la transcripción de las secuencias exógenas introducidas.

5 En una realización específica, los ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 presentados en esta invención pueden ser utilizados para prevenir tumores u otras formas de proliferación celular aberrante.

En la descripción también se presentan composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva de ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 de la descripción, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal y como se describe más adelante.

10 En otra realización, la descripción se refiere a métodos para inhibir la expresión de la secuencia de un ácido nucleico CXCR-4 en una célula procariótica o eucariótica que consiste en administrar a la célula una cantidad efectiva de una composición que contiene un ácido nucleico antisentido CXCR-4 de la invención.

Los ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 y sus usos se describen más abajo en detalle.

#### 5.5.2.1.1. ÁCIDOS NUCLEICOS ANTISENTIDO CXCR-4

15 Los ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 incluyen al menos seis nucleótidos y preferentemente son oligonucleótidos (variando de 6 a unos 50 oligonucleótidos). En aspectos específicos, el oligonucleótido incluye al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos o al menos 200 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena simple o doble. Los oligonucleótidos pueden ser modificados por la fracción base, la fracción de azúcar o el soporte de fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos agregados tales como péptidos, o agentes que facilitan el  
20 transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86.: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; Publicación PCT N° WO 88/09810, publicada el 25 de diciembre de 15, 1988) o barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión que desencadenan la hibridación (véase, por ejemplo, Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549).  
25

En un aspecto preferente de la descripción, se presenta un oligonucleótido antisentido CXCR-4, preferentemente de ADN de cadena simple. El oligonucleótido se puede modificar en cualquier posición de su estructura con sustituyentes generalmente conocidos en la técnica.

30 El oligonucleótido antisentido CXCR-4 puede comprender al menos una fracción base modificada seleccionada del grupo que incluye, entre otros, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-chlorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.  
35

40 En otra realización, el oligonucleótido comprende al menos una fracción de azúcar modificada seleccionada del grupo que incluye, entre otros, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otra realización adicional, el oligonucleótido comprende al menos un soporte de fosfato modificado seleccionado del grupo constituido por un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un alquil-fosfotriéster y un formacetal o sus análogos.

45 En otra realización adicional, el oligonucleótido es un oligonucleótido a-anomérico. Un oligonucleótido a-anomérico forma híbridos específicos de cadena doble con el ARN complementario en donde, al contrario que las unidades β usuales, las cadenas se extienden paralelas entre sí (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641).

El oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrecruzamiento desencadenado por una hibridación, un agente de transporte, agentes de escisión desencadenada por una hibridación, etc.

50 Los oligonucleótidos utilizados en la invención se pueden sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, con el uso de un sintetizador de ADN automático (tales como los disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos fosforotioatos se pueden sintetizar mediante el método de Stein et al. (1988, Nucl. Acids Res. 16.:3209), los oligonucleótidos metilfosfonato se pueden preparar utilizando soportes poliméricos vítreos de poro controlado (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.  
55

En una realización específica, el oligonucleótido antisentido CXCR-4 comprende ARN catalítico, o una ribozima (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT WO 90 /11364 publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225). En otra realización, el oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), o un análogo ARN-ADN quimérico (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

En una realización alternativa, el ácido nucleico antisentido CXCR-4 utilizado en la invención se produce intracelularmente mediante la transcripción a partir de una secuencia exógena. Por ejemplo, se puede introducir un vector in vivo de modo que sea tomado por una célula, dentro de cuya célula se transcribe el vector o una porción del mismo, produciéndose un ácido nucleico antisentido (ARN) de la invención. Tal vector podría contener una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido CXCR-4. Tal vector puede permanecer episómico o integrarse cromosómicamente, siempre y cuando se pueda transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores pueden ser contruidos mediante la recombinación de método de tecnología de ADN estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros conocidos en la técnica, utilizados para su replicación y expresión en células de mamíferos. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido CXCR-4 puede realizarse a través de cualquiera de los promotores que en la técnica se sabe que actúan en las células de mamíferos, preferentemente de seres humanos. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, entre otros: la región promotora inicial SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de la timidina-quinasa del herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), etc.

Los ácidos nucleicos antisentido utilizados en la invención comprenden una secuencia complementaria a al menos una porción de un transcrito de ARN de un gen CXCR-4, preferentemente un gen CXCR-4 humano. No obstante, la complementariedad absoluta, aunque es preferente, no es necesaria. Una secuencia "complementaria a al menos una porción de un ARN", tal y como se indica en el presente documento, significa una secuencia que tiene una complementariedad suficiente como para poder hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 de doble cadena, una cadena simple del ADN dúplex se puede ensayar así, o se puede ensayar la formación triplex. La capacidad para hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que se hibrida, más desigualdad de bases contendrá con un ARN CXCR-4 y todavía formará un dúplex estable (o triplex, según el caso). Aquellos versados en la técnica pueden determinar un grado tolerable de desigualdad mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

#### 5.5.2.1.2. USO TERAPÉUTICO DE LOS ÁCIDOS CXCR-4 ANTISENTIDO

Los ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 se pueden utilizar para tratar (o prevenir) trastornos de un tipo de célula que expresa, o preferentemente sobreexpresa, CXCR-4. En una realización específica, tal trastorno es un trastorno hiperproliferativo, por ejemplo, tumorigénesis. En una realización preferente, se utiliza un oligonucleótido antisentido CXCR-4 de ADN de cadena simple.

Los tipos de células que expresan o sobreexpresan ARN CXCR-4 se pueden identificar a través de varios métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, entre otros, la hibridación con un ácido nucleico específico al CXCR-4 (por ejemplo, mediante hibridación Northern, hibridación en mancha, hibridación in situ), observando la capacidad del ARN del tipo de célula a traducir in vitro a CXCR-4, inmunoensayo, etc. En un aspecto preferente, puede ensayarse el tejido primario de un paciente para conocer la expresión de CXCR-4 antes del tratamiento, por ejemplo, por inmunocitoquímica o una hibridación in situ.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la invención (véase la Sección 5.10), que comprenden una cantidad efectiva de un ácido nucleico antisentido CXCR-4 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, pueden ser administradas a un paciente que padezca una enfermedad o trastorno de un tipo que expresa o sobreexpresa un ARN o proteína CXCR-4.

La cantidad de ácido nucleico antisentido CXCR-4 que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o condición particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Siempre que sea posible, lo mejor es determinar la citotoxicidad antisentido del tipo de tumor a tratar in vitro y, después, en sistemas de modelos de animales útiles antes de 30 ensayarlo y utilizarlo en seres humanos.

En una realización específica, las composiciones farmacéuticas que comprenden ácidos nucleicos antisentido CXCR-4 se administran a través de liposomas, micropartículas o microcápsulas. En varias realizaciones de la invención, puede resultar útil utilizar tales composiciones para lograr la liberación sostenida de los ácidos nucleicos antisentido CXCR-4. En una realización específica, puede resultar deseable utilizar liposomas dirigidos a través de anticuerpos a antígenos específicos de un tumor identificable (Leonetti et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2448-2451; Renneisen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:16337-16342).

En la Sección 5.9.1.4 se describen métodos adicionales que pueden ser adaptados para su uso en la administración de un ácido nucleico antisentido CXCR-4.

## 5.6. DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA O PROFILÁCTICA

La actividad terapéutica o profiláctica de los Terapéuticos de la invención se ensaya preferentemente in vitro y, después, in vivo, antes de su uso en seres humanos.

Por ejemplo, entre los ensayos in vitro que pueden ser utilizados para determinar si está indicada la administración de un Terapéutico específico, cabe incluir ensayos de cultivos de células in vitro en los cuales se cultiva la muestra de un tejido del paciente en un cultivo y se expone o administra de cualquier otro modo a un Terapéutico y se observa el efecto de tal Terapéutico en la muestra del tejido. En una realización, en la que el paciente tiene un tumor maligno, se coloca en una placa o se cultiva en un cultivo una muestra de células de dicho tumor maligno y, a continuación, se exponen las células a un Terapéutico. Se selecciona un Terapéutico capaz de inhibir la supervivencia o crecimiento de las células malignas para su uso terapéutico in vivo. Se pueden utilizar muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular se puede ensayar midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, mediante un recuento celular directo, detectando los cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, *fos*, *myc*) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul tripán, la diferenciación puede evaluarse visualmente en base a los cambios en la morfología, etc.

En otra realización, está indicado el uso de un Terapéutico que presenta el efecto deseado, inhibición o promoción del crecimiento celular, en una muestra de células de un paciente procedentes de un tejido que tiene o se sospecha que tiene un trastorno hiper- o hipoproliferativo, respectivamente. Tales trastornos hiper- o hipoproliferativos incluyen, entre otros, los descritos en la presente invención.

En otra realización específica, el uso de un Terapéutico está indicado en el tratamiento de lesiones celulares o de un trastorno degenerativo que in vitro presenta una promoción del crecimiento/proliferación de células del tipo de paciente afectado.

En varias realizaciones específicas, pueden realizarse ensayos in vitro con células representativas de los tipos de células involucradas en el trastorno de un paciente, para determinar si un Terapéutico tiene el efecto deseado sobre dicho tipo de células.

En otra realización, las células de una muestra de tejido de un paciente que se sospecha son preneoplásicas, se cultivan de igual manera en placas o se cultivan in vitro y se exponen a un Terapéutico. El Terapéutico que da como resultado el fenotipo celular más normal (a saber, menos representativo de un estado preneoplásico, estado neoplásico, estado maligno o fenotipo transformado) se selecciona para un uso terapéutico. Pueden utilizarse muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar si hay presente un estado preneoplásico, estado neoplásico o un fenotipo transformado o maligno. Por ejemplo, las características asociadas con un fenotipo transformado (un conjunto de características in vitro asociadas con una capacidad tumorigénica in vivo) incluyen la morfología de las células más redondeada, pérdida de la unión al sustrato, pérdida de inhibición de contacto, pérdida de dependencia del anclaje, liberación de proteasas tal como el activador de plasminógeno, aumento del transporte de azúcar, disminución del requerimiento de suero, expresión de antígenos fetales, desaparición de la proteína de superficie de 250.000 Dalton, etc. (véase Luria et al., 1978, General Virology, 3d Ed., John Wiley & Sons, New York pp. 436-446).

En otras realizaciones específicas, los ensayos in vitro arriba descritos pueden llevarse a cabo utilizando una línea celular, en lugar de una muestra de células derivada del paciente específico a tratar, en donde la línea celular se deriva de o muestra una o varias características asociadas al tumor maligno, al trastorno neoplásico o preneoplásico que se desea tratar o prevenir, o se deriva del tipo de célula sobre que se desea un efecto, según la presente invención.

Los compuestos a utilizar en la terapia se pueden ensayar en sistemas apropiados de modelos de animales antes de su ensayo en seres humanos, incluidos, entre otros, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos. Para el ensayo in vivo, antes de su administración a seres humanos, puede utilizarse cualquier sistema de modelos animales conocido en la técnica.

## 5.7. ADMINISTRACIÓN Y COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS/PROFILÁCTICAS

En la invención se presentan Terapéuticos de la invención para su uso en métodos de tratamiento (y profilaxis) mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva del Terapéutico de la invención. En un aspecto preferente, el Terapéutico está sustancialmente purificado. El sujeto es preferentemente un animal, incluidos, entre otros, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferentemente un mamífero y, mejor aún, un ser humano. En una realización específica, el sujeto es un mamífero no humano.

Las formulaciones y los métodos de administración que pueden ser utilizados cuando el Terapéutico comprende un ácido nucleico ya se han descrito arriba. Pueden seleccionarse formulaciones y vías de administración apropiadas adicionales de entre las que se describen de aquí en adelante.

- Se conocen varios sistemas de suministro que pueden ser utilizados para administrar un Terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el Terapéutico, endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico del Terapéutico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Entre los métodos de introducción cabe incluir, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de la capa de revestimiento epitelial o mucocutánea (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.
- Además, puede resultar deseable introducir un Terapéutico de la invención en el sistema nervioso central a través de cualquier ruta conveniente incluida, entre otras, la inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede ser facilitada a través de un catéter intraventricular, por ejemplo, acoplado a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Pueden utilizarse agentes que mejoran el suministro de compuestos quimioterapéuticos a tumores cerebrales, tales como agonistas que activan receptores específicos en células endoteliales que regulan la permeabilidad, incluidos, por ejemplo, agonistas de la bradiquinina (véase, por ejemplo, Elliott, et al., 1996, Cancer Research 56:3998-4005), factores de angiogénesis tumoral (Cserr and Knopf, 1992, Immunol Today 12:507-512), etc., en formulaciones y métodos de administración cuando el Terapéutico está previsto para el suministro a un tumor del sistema nervioso central.
- En una realización específica, puede hacerse uso de una inyección en el fluido espinal, y/o procedimientos en los que se utiliza un depósito Ommaya, para introducir un Terapéutico de la invención tal como un anticuerpo anti-CXCR-4, por ejemplo, un anticuerpo anti-CXCR-4 biespecífico, directamente en el sistema nervioso central para la inmunoterapia de un tumor.
- En otra realización específica adicional, se utiliza un anticuerpo anti-CXCR-4, por ejemplo, un anticuerpo anti-CXCR-4 biespecífico, como Terapéutico en un tratamiento inmunoterapéutico de un tumor no cerebral y se infunde en un destinatario por vía intravenosa.
- Las células inmunitarias, por ejemplo, células dendríticas o células T citotóxicas, pueden cruzar la barrera hematoencefálica y tener acceso al tejido cerebral, especialmente en presencia de factores de angiogénesis tumoral (Cserr and Knopf, 1992, Immunol. Today, 12:507-512). En una realización preferente, las células dendríticas activadas (HLA-coincidente con el destinatario) (véase en general, Tjoa et al., 1996, Prostate 28.: 65-69) que se han visto expuestas a una proteína CXCR-4, análogo o derivado de la misma, se infunden en un destinatario bajo condiciones que permiten que crucen la barrera hematoencefálica, por ejemplo, en presencia de factores de angiogénesis tumoral. En otra realización preferente, las células T citotóxicas activadas (HLA-coincidente con el destinatario) (véase en general, Tjoa et al., 1996, Prostate 28.: 65-69) que se han visto expuestas ex vivo (a saber, in vitro) a una proteína CXCR-4, análogo o derivado de la misma, se infunden en un destinatario bajo condiciones que permiten que crucen la barrera hematoencefálica.
- En otra realización específica adicional, se administra un Terapéutico de la invención, por ejemplo, células dendríticas activadas que se han visto expuestas a una proteína CXCR-4, análogo o derivado de la misma, o células T citotóxicas activadas que se han visto expuestas ex vivo, células dendríticas que se han visto expuestas a una proteína CXCR-4, análogo o derivados de la misma, para el tratamiento de un tumor no cerebral.
- También puede hacerse uso de una administración pulmonar de un Terapéutico utilizando, por ejemplo, un inhalador o un nebulizador, y una formulación con un agente aerosolizador.
- En una realización específica, puede resultar deseable administrar el Terapéutico de la invención localmente en el área que necesita el tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, entre otras, a través de la infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito en la herida después de una cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio original) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.
- En otra realización, el Terapéutico se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990 Science 2\_49:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase en general *ibid.*)
- En otra realización adicional, el Terapéutico puede ser suministro en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización pueden utilizarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61;

véase también Levy et al., 1985 Science 228:190; During et al., 1989 Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989 J. Neurosurg. 71:105). En otra realización adicional, puede colocarse un sistema de liberación controlada cerca del destino terapéutico, a saber, el cerebro, necesitando de este modo sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

5 En la reseña de Langer se mencionan otros sistemas de liberación controlada (Science 24J.-1527-1533 (1990)).

En una realización específica donde el Terapéutico es un ácido nucleico que codifica un Terapéutico proteínico, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para favorecer la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión del ácido nucleico adecuado y administrándolo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente Estadounidense N° 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriéndolo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en unión con un péptido tipo homeótico que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un Terapéutico de ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

En la presente descripción también se presentan composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un Terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o de un estado, o presente en la lista de la Farmacopea de Estados Unidos o en cualquier otra farmacopea reconocida a nivel general para su uso en animales y, más concretamente, en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o cualquier otro medio a través del cual se administra el Terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos esterilizados, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. El agua es el vehículo preferente cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos también pueden utilizarse soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol, sobre todo para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados cabe incluir almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y análogos. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes y emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Las composiciones pueden presentarse en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, pastillas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación controlada y análogos. La composición se puede formular a modo de supositorio, con vehículos y aglutinantes tradicionales tales como triglicéridos. 15 La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del Terapéutico, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad de vehículo adecuada para obtener la forma para la administración correcta al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

En una realización preferente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones de administración intravenosa son soluciones en un tampón acuoso isotónico esterilizado. En caso necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para mitigar el dolor en el lugar de la inyección. Por lo general, los ingredientes se suministran bien por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o un sobre en el que se indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición vaya a ser administrada por infusión, ésta puede ser dispensada con un frasco de infusión que contiene agua o una solución salina esterilizadas de calidad farmacéutica. Cuando la composición vaya a ser administrada por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua para inyección o una solución salina esterilizadas para que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

50 Los Terapéuticos de la invención se pueden formular a modo de formas neutras o sales. Entre las sales farmacéuticamente aceptables cabe incluir aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaina, etc.

55 La cantidad del Terapéutico utilizado en la invención que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o condición particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Adicionalmente, pueden realizarse ensayos in vitro para ayudar a identificar los niveles de dosificación óptimos. La dosis precisa a utilizar en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se deberá decidir de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. No obstante, los niveles de dosificación adecuados para la administración intravenosa son, por lo general,

de unos 20-500 30 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los niveles de dosificación adecuados para la administración intranasal son generalmente de 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

- 5 Los supositorios generalmente contienen el ingrediente activo 5 en el rango de un 0,5% a un 10% en peso; las formulaciones orales preferentemente contienen de un 10% a un 95% de ingrediente activo.

En la invención también se presenta un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado a dicho recipiente o recipientes puede haber un informe en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso y la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte de la agencia con respecto a la fabricación, uso o venta para la administración humana.

10

### 5.7.1. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE TRASTORNOS HIPOPROLIFERATIVOS

Entre las enfermedades o trastornos que involucran la proliferación celular reducida o en los que la proliferación celular es deseada para un tratamiento o prevención, y que pueden ser tratados o prevenidos promoviendo la función de CXCR-4, cabe incluir, entre otros, trastornos degenerativos, deficiencias en el crecimiento, trastornos hipoproliferativos, trauma físico, lesiones y heridas; o ejemplo, para promover la cicatrización de heridas, o para promover la regeneración en tejidos degenerados, lesionados o dañados, etc. En una realización específica, también se tratan los trastornos del sistema nervioso. En otra realización específica, se trata un trastorno que no es del sistema nervioso.

15

- 20 Entre las lesiones que pueden ser tratadas según la presente invención cabe incluir, entre otras, las siguientes:

- (i) lesiones traumáticas, que incluyen lesiones causadas por un daño físico o asociadas a una cirugía;
- (ii) lesiones isquémicas, en las que la falta de oxígeno da como resultado una lesión o muerte de las células, por ejemplo, infarto o isquemia de miocardio o cerebral, o infarto o isquemia de la médula espinal;
- (iii) lesiones malignas, en las que las células son destruidas o dañadas por un tejido maligno;
- (iv) lesiones infecciosas, en las que el tejido es destruido o dañado como resultado de una infección, por ejemplo, por un absceso o asociado a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, herpes zoster, o virus herpes simplex o a la enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis;
- (v) lesiones degenerativas, en las que el tejido es destruido o dañado como resultado de un proceso degenerativo, incluida, entre otras, la degeneración del sistema nervioso asociado a la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, o esclerosis lateral amiotrófica;
- (vi) lesiones asociadas a enfermedades o trastornos nutricionales, en las que el tejido es destruido o dañado por un trastorno nutricional o trastorno del metabolismo incluidas, entre otras, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ambliopía por tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del corpus callosum), y degeneración cerebelosa alcohólica;
- (vii) lesiones asociadas a enfermedades sistémicas incluidas, entre otras, la diabetes o lupus eritematoso sistémico;
- (viii) lesiones causadas por sustancias tóxicas que incluyen alcohol, plomo u otras toxinas; y
- (ix) lesiones desmielinadas del sistema nervioso en las que una porción del sistema nervioso es destruida o dañada por una enfermedad desmielinizante incluyendo, entre otras, esclerosis múltiple, mielopatía asociada al virus de inmunodeficiencia humana, mielopatía transversa o varias etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva y mielínolisis central pontina.

25

30

35

40

45

Según la presente descripción, las lesiones del sistema nervioso que pueden ser tratadas en un paciente (incluidos pacientes mamíferos humanos y no humanos) incluyen, entre otras, las lesiones tanto del sistema nervioso central (incluyendo la médula espina, cerebro) como del sistema nervioso periférico.

Los terapéuticos que son útiles según esta realización de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno pueden seleccionarse ensayando su actividad biológica para favorecer la supervivencia o diferenciación de células (véase también la sección 5.9). Por ejemplo, en una realización específica relativa a una terapia del sistema nervioso, según la invención puede resultar útil un Terapéutico que produce uno de los siguientes efectos:

50

- (i) aumento de la ramificación de las neuronas en cultivo o in vivo;

- (ii) aumento de la producción de una molécula asociada a las neuronas en cultivo o in vivo, por ejemplo, colina-acetiltransferasa o acetilcolinesterasa respecto a las neuronas motoras; o
- (iii) disminución de los síntomas de la disfunción neuronal in vivo.

Tales efectos pueden medirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En las realizaciones preferentes, pero no excluyentes, el aumento de la ramificación de las neuronas se puede detectar según los métodos expuestos en Pestronk et al. (1980, Exp. Neurol. 20:65-82) o Brown et al. (1981, Ann. Rev. Neurosci. 4:17-42); y el aumento de la producción de moléculas asociadas a las neuronas se puede medir a través de bioensayo, ensayo enzimático, unión de anticuerpos, ensayo Northern blot, etc., dependiendo de la molécula a medir.

## 5.8. USO ADICIONAL DE UN AUMENTO DE LA FUNCIÓN DE CXCR-4 PARA ESTIMULAR EL AUMENTO DEL CRECIMIENTO

La estimulación de la función de CXCR-4 (por ejemplo, administrando un compuesto que estimule la función de CXCR-4 como se describe más abajo), tiene una utilidad que no sólo se limita a aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Por ejemplo, la función de CXCR-4 se puede estimular para aumentar el crecimiento de animales (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, cabras, ciervos, pollos) y plantas (en especial plantas comestibles, por ejemplo, tomates, melones, lechugas, zanahorias, patatas, y otras verduras), sobre todo de aquellos que son fuentes de alimentos o materiales. En una realización de la descripción, en la que un ácido nucleico CXCR-4 se encuentra bajo el control de un promotor específico de tejidos, el ácido nucleico se puede utilizar en plantas o animales para aumentar el crecimiento donde se desee (por ejemplo, en la fruta o el músculo). Por ejemplo, un ácido nucleico CXCR-4 bajo el control de un promotor sensible a la temperatura, puede ser administrado a una planta o a un animal y la porción deseada de (o toda) la planta o animal puede verse sometida a calor para inducir la producción de ácido nucleico CXCR-4 que da como resultado un aumento de la expresión de CXCR-4 y, a su vez, la proliferación celular. Los métodos para hacer plantas recombinantes son muy conocidos en la técnica y pueden ser utilizados. En relación con los métodos de transformación de plantas (por ejemplo, para la transformación con un ácido nucleico antisentido CXCR-4), véase, por ejemplo, Valvekens et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5536-5540. En relación con los métodos de inactivación génica dirigida en plantas (por ejemplo, para inactivar el CXCR-4), véase, por ejemplo, Miao and Lam, 1995, The Plant J. 7:359-365.

La estimulación de la función de CXCR-4 también tiene usos in vitro, por ejemplo, para expandir células in vitro, incluidas, entre otras, células madre, células progenitoras, células musculares, fibroblastos, células hepáticas, etc., por ejemplo, para cultivar células/tejidos in vitro antes de su administración a un paciente (preferentemente un paciente del que se derivaron las células), etc.

## 5.9. CRIBADO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE CXCR-4

Los ácidos nucleicos y proteínas CXCR-4, y sus derivados, también pueden ser utilizados en ensayos de cribado para la detección de moléculas que se unan específicamente a los ácidos nucleicos y proteínas CXCR-4, o sus derivados, y puedan ser utilizados así potencialmente como agonistas o antagonistas de CXCR-4, en particular, moléculas que de este modo afectan la proliferación celular. En una realización preferente de la descripción, tales ensayos se realizan para cribar moléculas con una utilidad potencial como fármacos contra el cáncer o compuestos principales para el desarrollo de fármacos. Así, en la descripción se presentan ensayos para detectar moléculas que se unen específicamente a ácidos nucleicos y proteínas CXCR-4, o sus derivados. Por ejemplo, las células recombinantes que expresan ácidos nucleicos CXCR-4 pueden ser utilizadas para producir de manera recombinante proteínas CXCR-4 en estos ensayos, para cribar moléculas que se unen a una proteína CXCR-4. Las moléculas (por ejemplo, ligandos putativos de CXCR-4) se ponen en contacto con la proteína CXCR-4 (o un fragmento de la misma) bajo condiciones propicias para su unión y, a continuación, se identifican las moléculas que se unen específicamente a la proteína CXCR-4. Pueden utilizarse métodos similares para cribar moléculas que se unen a derivados o ácidos nucleicos CXCR-4. Los métodos que pueden utilizarse para llevar a cabo lo anterior, son bien conocidos en la técnica.

A título de ejemplo, pueden cribarse librerías de diversidad, tales como librerías peptídicas o no peptídicas aleatorias o combinatorias en busca de moléculas que se unen específicamente al CXCR-4. Hay muchas librerías conocidas en la técnica que pueden utilizarse, por ejemplo, librerías sintetizadas químicamente, recombinantes (por ejemplo, librería de visualización de fagos), y librerías basadas en traducciones in vitro.

Ejemplos de librerías químicamente sintetizadas se describen en Fodor et al., 1991, Science 251:767-773; 5 Houghten et al., 1991, Nature 354:84-86; Lam et al., 1991, Nature 354: 82-84; Medynski, 1994, Bio/Technology 12: 709-710; Gallop et al., 1994, J. Medicinal Chemistry 32(9):1233-1251; Ohlmeyer et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926; Erb et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426; Houghten et al., 1992, Biotechniques 13: 412; Jayawickreme et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618; Salmon et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712; PCT Publication No. WO 93/20242; and Brenner and Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383.

Ejemplos de librerías de visualización de fagos se describen en in Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin et al., 1990, Science, 249:404-406; Christian, R.B., et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:711-718); Lenstra, 1992, J. Immunol. Meth. 152:149-157; Kay et al., 1993, Gene 128:59-65; y Publicación PCT N° WO 94/18318 con fecha 18 de agosto de 1994.

- 5 Entre las librerías basadas en traducciones in vitro cabe incluir, entre otras, aquellas descritas en la Publicación PCT n° WO 91/05058 con fecha 18 de abril de 1991; y Mattheakis et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026.

A título de ejemplo de librerías no peptídicas, puede adaptarse una librería de benzodiazepinas (véase, por ejemplo, Bunin et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712) para su uso. También pueden utilizarse librerías de peptoides (Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371). Otro ejemplo de una librería que puede ser utilizada, en la que las funcionalidades amida de los péptidos se han permitilado para generar una librería combinatoria químicamente transformada, se describe en (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142).

El cribado de las librerías puede ir acompañado por cualquiera de entre una variedad de métodos conocidos a nivel general. Véanse, por ejemplo, las referencias siguientes en las que se presenta un cribado de librerías de péptidos: Parmley and Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218; Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Fowlkes et al., 1992; BioTechniques 13:422-427; Oldenburg et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397; Yu et al., 1994, Cell 76:933-945; Staudt et al., 1988, Science 241:577-580; Bock et al., 1992, Nature 355:564-566; Tuerk et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992; Ellington et al., 1992, Nature 355:850-852; Patente Estadounidense N° 5.096.815, Patente Estadounidense N° 5.223.409, y Patente Estadounidense N° 5.198.346, todas ellas de Ladner et al.; Rebar and Pabo, 1993, Science 263:671-673; y Publicación PCT N° WO 94/18318.

20 En una realización específica de la descripción, el cribado puede llevarse a cabo poniendo en contacto los miembros de la librería con una proteína CXCR-4 (o ácido nucleico o derivado) inmovilizada sobre una fase sólida y recogiendo aquellos miembros de la librería que se unen a la proteína (o ácido nucleico o derivado). Ejemplos de tales métodos de cribado, denominados técnicas "barrido" se describen a título de ejemplo en Parmley and Smith, 1988, Gene 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques 13:422-427; Publicación PCT N° WO 94/18318; y en las referencias citadas más arriba.

En otra realización de la descripción, puede utilizarse el sistema de dos híbridos para seleccionar proteínas que interactúan en la levadura (Fields and Song, 1989, Nature 340:245-246; Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582) para identificar moléculas que se unen específicamente a una proteína CXCR-4 o su derivado.

#### 5.10. MODELOS DE ANIMALES

30 En la descripción también se presentan modelos de animales. En una realización, se presentan modelos de animales para enfermedades y trastornos en los que interviene una hipoproliferación celular (por ejemplo, como se describe en la Sección 5.8.1). Tal animal puede producirse inicialmente promoviendo una recombinación homóloga entre un gen CXCR-4 en su cromosoma y un gen CXCR-4 exógeno que se ha inactivado biológicamente (preferentemente mediante la inserción de una secuencia heteróloga, por ejemplo, un gen resistente a los antibióticos). En un aspecto preferente, esta recombinación homóloga se lleva a cabo transformando células madre derivadas de embriones (ES) con un vector que contiene el gen CXCR-4 inactivado por inserción, con lo que se produce una recombinación homóloga, seguido de la inyección de las células ES en un blastocisto, e implantar el blastocisto en una madre adoptiva, seguido del nacimiento del animal quimérico ("animal noqueado") en el que un gen CXCR-4 ha sido inactivado (véase Capecchi, 1989, Science 244:1288-1292). Este animal quimérico se puede reproducir para crear animales noqueados adicionales. Tales animales pueden ser ratones, hámsters, ovejas, cerdos, ganado, etc., y preferentemente no son mamíferos ni humanos. En una realización específica se produce un ratón noqueado.

Se espera que tales animales noqueados desarrollen o estén predispuestos a desarrollar enfermedades o trastornos en los que interviene la hipoproliferación celular. Tales animales pueden ser utilizados para cribar o ensayar moléculas en cuanto a su capacidad de promover la proliferación y, por tanto, tratar o prevenir tales enfermedades y trastornos.

En una realización diferente de la descripción, los animales transgénicos que se han incorporado y expresan un gen CXCR-4 funcional, pueden ser utilizados como modelos de animales de enfermedades y trastornos en los que interviene una hiperproliferación celular o tumor maligno. Se espera que tales animales desarrollen o están predispuestos a desarrollar enfermedades o trastornos en los que interviene una hiperproliferación celular (por ejemplo, tumor maligno) y, por tanto, puedan ser utilizados como modelos de animales de tales enfermedades y trastornos para, por ejemplo, cribar o ensayar moléculas (por ejemplo, terapéuticos potenciales contra el cáncer) en cuanto a su capacidad de inhibir la sobreproliferación (por ejemplo, formación de tumores) y, así, tratar o prevenir tales enfermedades o trastornos.

#### 55 6. EJEMPLO AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CXCR-4 A PARTIR DE UN TEJIDO TUMORAL DE GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES HUMANO

En este estudio se caracterizó la función de CXCR-4, un receptor acoplado a la proteína G en la tumorigénesis cerebral.

## 6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

### Hibridación diferencial de matrices de expresión humanas Atlas™

- 5 Para identificar los genes alterados durante la génesis de glioblastomas humanos, se utilizaron las técnicas de Visualización diferente-PCR (DD-PCR) y de hibridación diferencial de las matrices de expresión de ADNc humano. (Pueden encontrarse ejemplos de protocolos de DD-PCR en Sehgal et al. , 1997, J. Surg. Oncol. 64:102-108; Sehgal et al. , 1997, J. Surg. Oncol. 65:249-257; Sehgal et al., 1997, Int. J. Cancer 71:565-572; Sehgal et al., 1996, Exp. Lung. Res. 22:419-434).
- 10 La técnica de Hibridación diferencial de matrices de expresión de ADNc humano se llevó a cabo utilizando el protocolo recomendado por Clontech. Brevemente, se aislaron 10 µg de ARN total del GMTT humano. El ARN total para el NBT (tejido cerebral normal) se compró en Clontech (Palo Alto, CA). 10 µg de ARN total de cada muestra de tejido se trataron con 5 µl de 2 unidades/µl de DNaseI durante 30 minutos a 37°C. La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo utilizando oligo (dT) 0 y cebadores hexámeros aleatorios utilizando la síntesis Advantage cDNA del kit de PCR bajo las condiciones recomendadas por Clontech (Palo Alto, CA) . A continuación se hibridó una cantidad igual del ADNc del GMTT o del NBT (1x10<sup>6</sup> cpm/ml) con dos membranas de matriz de expresión de ADNc humano Atlas™ idénticas en bolsas separadas durante 18 horas a 65°C en una solución de hibridación exprés de Clontech. A continuación se lavaron las membranas y se expusieron después a una película de rayos X a -80°C durante 48 horas.

### RT-PCR específica al gen

- La técnica de RT-PCR específica al gen se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente (Sehgal et al. , 1997 J. Surg. Oncol. 64:102-108). Para llevar a cabo la PCR se utilizaron cebadores CXCR-4 (5'CTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACAT3'(ID SEC N°:), 5 'AGACTGTACACTGTAGGTGCTGAAA TCA3 1 (ID SEC N°:)) La PCR para DI-2 (un gen de la subunidad 1 de la Citocromo C oxidasa mitocondrial, número de acceso D3 8112), se llevó a cabo un gen de mantenimiento utilizando cebadores específicos (5 1 CGGAGCAATATGAAATGATCT3 \* (ID SEC N° : , 5 ' GCAAATACAGCTCCTATTG3 ' (ID SEC N°:). La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones anteriormente descritas en detalle (Sehgal et al., 1997 J. Surg. Oncol. 64:102-108). A continuación se aplicó el producto de la PCR a un gel de agarosa al 1,2%. El ADN fue transferido a una membrana Hybond N+ MagnaCharge (Amersham, Arlington Heights, IL) bajo las mismas condiciones estándar de Southern blot que las descritas anteriormente (Sambrook et al. , 1989 Cold Spring Harbour NY, Cold Spring Laboratory). La hibridación se llevó a cabo utilizando una sonda específica para el gen de 1x10<sup>5</sup> cpm/ml a 42°C durante 18 horas. Las sondas específicas al gen se prepararon etiquetando los cebadores internos mediante el sistema Multiprime (CXCR-4, 5'1ATCTGTTTCCACTGAGTCTGATCTTCAAGT TTTCACCCAGCTAACACA3 1 (ID SEC N°: y el gen de mantenimiento DI -2, 51TAGGCCTGACTGG CATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGAG3' (ID SEC N°:)) utilizando el kit de etiquetado Megaprime de Amersham (Arlington Heights, IL). El gen DI-2 ya ha sido utilizado en el pasado como gen de mantenimiento en la aplicación RT-PCR (Sehgal et al., 1997 J. Surg. Oncol., Sehgal et al., 1997 J. Surg. Oncol. 64: 102-105). La cuantificación de las Southern blots resultantes de la RT-PCR se llevó a cabo con el programa de cuantificación de volúmenes ImageQuANT™ del Molecular Dynamics Phosphor Imager. Con la cuantificación del volumen se calcula el volumen bajo la superficie creado a través de un gráfico en 3-D de las localizaciones de los píxeles y los valores de los píxeles. Se cuantificó el volumen (la intensidad integrada de todos los píxeles del punto excluido el fondo) de las bandas de CXCR-4 en las Southern blots. Estos valores de los píxeles se normalizan entonces con los valores de los píxeles de las bandas del gen de mantenimiento (DI-2 denominado con la letra H) y se muestran como una expresión relativa en la Figura 1. Los términos subjetivos de "baja", "media" y "alta" del texto se refieren a la expresión relativa y se basan en la expresión de CXCR-4 en el NBT como "baja" y en HTB16 y GB1690 como "alta".

### Hibridación in situ

- La técnica de la hibridación in situ se llevó a cabo conforme a lo descrito anteriormente (Wilkinson, 1992 In Situ Hybridization, A practical approach. NY: Oxford University Press). En pocas palabras, se desparafinaron dos secciones de tumores cerebrales humanos embebidas en parafina y fijadas en 6 µm de formalina mediante 2 lavados en xileno, seguido de una rehidratación a través de concentraciones medidas de etanol de un 100% a un 70%. Éstos se lavaron después en PBS y se trataron con Proteinasa K (25 mg/ml durante 10 minutos), seguido de la fijación en paraformaldehído al 4%. Tras su incubación en anhídrido acético al 0,25% /0,1 M de TEA (ácido Tri-Etil Acético), las secciones se deshidrataron con concentraciones medidas de etanol de un 70% a 100% y se prehibridaron durante 2 horas a 55°C en formamida al 50%, 5xSSC pH 4,5, 50 µg/ml de ARNt, 50 µg/ml de heparina, y SDA al 1%. Las secciones se hibridaron con 1 µg/ml de sondas antisentido y de sentido etiquetadas con DIG (Digoxigenina) durante 18 horas a 55°C. Las sondas se sintetizaron con el kit Genius 4 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) utilizando los promotores T3 y T7 de una plantilla de PCR derivada del ADNc CXCR-4 humano correspondiente a las bases 1061-1618. La plantilla de PCR se amplificó mediante cebadores

5'CAAGCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAGGGCTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACAT 3' (ID SEC N°: ) y 5'CACTTAATACTACGACTCACTATAGGGAGACTGTACACTGTAGGTGCGAAATCA 31 (ID SEC N°: ) que contienen los promotores T3 y T7, respectivamente, añadidos a la secuencia de CXCR-4 humano correspondiente a las bases 1061-1087 y 1591-1618. Tras la hibridación, los portamuestras se lavaron en formamida al 50%, 2xSSC pH 4,5, SDS al 1% a 50°C, tratado con 5 µg/ml de RNasa A durante 30 minutos a 37°C, y se lavaron en formamida al 50%, 2xSSC pH 4,5 a 50°C. Las secciones se prebloquearon en un suero de oveja normal al 10% (Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron con una disolución 1:2000 de fragmentos Fab anti-dioxigenina conjugados a fosfato alcalino (Boehringer Mannheim) durante 18 horas a 4°C. Para la detección, los portamuestras se incubaron con NBT/BCIP (sal de 4-toluidina, fosfato de 5-Bromo-4-cloro-3-indoilo) en la oscuridad durante 46 horas. Tras contramanchar con eosina Y, los portamuestras se montaron con Permout y se visualizaron utilizando un microscopio de rutina Axioskop (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

#### Análisis Northern blot de múltiples tejidos

Se compraron a Clontech (Palo Alto, CA) hibridaciones de Múltiples Tejidos Normales Humanos (MNHTB). Estas hibridaciones contenían 2µg de ARNm poliA+ puro. Los MNHTB se hibridaron previamente en una solución tampón de hibridación rápida (Clontech) durante 3-4 horas. La hibridación se realizó con sondas CXCR-4 de 0,55 Kb etiquetadas mediante el sistema Multiprime (posiciones 1591-1618). Las hibridaciones se lavaron en 0,1xSSC y una solución de SDS al 0,1 % SDS durante 60 minutos a 50°C. Tras la exposición autorradiográfica, se extrajo la sonda CXCR-4, y el gen β actina humano se utilizó como control interno. La expresión relativa de CXCR-4 se calculó en la forma arriba descrita 30.

#### Análisis de hibridación de animales

Se adquirió una membrana de hibridación de animales que contiene 5µg de ADN genómico predigerido (EcoRI) en Clontech (Palo Alto, CA). La hibridación de animales se prehibridó según el método recomendado por Clontech (Palo Alto, CA). Se etiquetó un fragmento de CXCR-4 de 0,55 Kb (1061-1618) con dCTP32 utilizando un kit de etiquetado de cebadores decáneris de Ambion (Austin, TX) y se utilizó como sonda para la hibridación. El lavado de la hibridación se realizó según el método recomendado por Clontech. Para aislar el fragmento de CXCR-4 de 0,557 Kb para su etiquetado como sonda, se utilizaron 125 ng de ADNc (preparados utilizando un cebador oligodT y hexámero aleatorio de la línea celular de neuroblastoma humano) como plantilla. La amplificación de la PCR del fragmento de CXCR-4 se realizó utilizando cebadores específicos para genes (5'CTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACAT31 (ID SEC N°: ) y 51TGATTTCAGCACCTACAGTGTACAGTCT31 (ID SEC N°: )) utilizando las condiciones de PCR descritas anteriormente (Sehgal et al., 1997 J. 15 Surg. Oncol. 65:249-257, Sehgal et al., 1997 J. Surg. Oncol. 64 : 102-108) .

#### Clonación del clon de longitud completa para el gen CXCR-4

Se cribó una librería de cerebros humanos fetales (Stratagene, LaJolla, CA) con un producto de la PCR de 0,55 Kb específico al CXCR-4 (aislado de la línea celular de Neuroblastoma utilizando cebadores de la PCR específicos al CXCR-4). Se identificaron tres clones positivos y se aislaron placas individuales tras un cribado secundario de la librería. Para determinar el tamaño del inserto de estos clones, se realizó una PCR utilizando pfu Taq ADN Polimerasa (Stratagene). El producto de la PCR se aplicó a un gel de agarosa al 1,2%. El análisis de la secuencia dejó de manifiesto que el clon n° 3 contenía un inserto de 2,0 Kb y que es idéntico al clon de CXCR-4 de longitud completa aislado previamente. Para subclonar el gen CXCR-4 de longitud completa en pCMV-neo, su región de codificación se amplificó mediante una PCR con cebadores específicos que contenían SacII y SpeI (sitios subrayados), (5'AGATAGATCCGCGGACCATGGAGGGGATCAGTATATA3' (ID SEC N° : ) , 5'TAGATACAAGTGTGTAGCTGGAGTGAAAACCTTGA3 1 (ID SEC N° : ) ) . A continuación se digirió el vector pCMV-neo con SacII y SpeI y se ligó al producto de la PCR de CXCR-4 predigerido con SacII y SpeI. Para clonar el CXCR-4 en la dirección antisentido, se utilizaron cebadores específicos al CXCR-4 (5'AGATAGATCCGCGGGTGTAGCTGGAGTGAAAACCTTGA3' (ID SEC N°: ) y 5'TAGATACAAGTAGTACCATGGAGGGGATCAGTATATA3 1 (ID SEC N°: ) para llevar a cabo la PCR y se clonaron en el vector pCMV-neo predigerido en una dirección de sentido y antisentido. La orientación del gen CXCR-4 se confirmó por secuenciación.

#### Ensayo de crecimiento

El ensayo de crecimiento de las células del CXCR4 transfectadas se realizó utilizando un kit de proliferaciones celulares de Promega (Madison, WI) tal y como se ha descrito anteriormente (Huang et al., 1995 Cancer Research 55: 5054-5062). En pocas palabras, en una placa de 96 pozos se colocaron por triplicado 1000 células de tipo salvaje y de tipo de expresión mutante. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y se añadieron 80µl de colorante. Pasadas 4 horas, se añadieron 15µl de solución stop y se incubaron durante 18 horas. A continuación se registró la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas ELISA.

#### Ensayo en agar suave

El ensayo en agar suave se realizó en la forma descrita anteriormente (Huang et al., 1995) Cancer Research 55: 5054-5062. En pocas palabras, las células GB1690 que se transfectaron con el vector solo y con el CXCR-4 en la dirección del sentido se tripsinizaron. Aproximadamente el  $5 \times 10^6$  o el  $1 \times 10^6$  de la célula se mezcló con agar al 0,26%. A continuación, las células se pusieron en placas encima de una capa de agar al 0,65% en placas de Petri de 60 mm y se incubaron a 37°C durante 2-4 semanas. Las células fueron alimentadas con un medio que contenía suero cada 10 días. Las colonias se contaron con el microscopio de luz invertida.

#### Inmunocitoquímica

Se colocaron en placas  $1 \times 10^4$  células en portamuestras con cámaras de Lab Tek (Nunc, Naperville Pasadas 24 horas, las células se lavaron en PBS. A continuación se cubrieron las células con paraformaldehído al 4% (Sigma, St. Louis MO) y se incubaron a 4°C durante 2-4 horas. Después volvieron a lavarse las células en PBS de nuevo, y se colocaron en los portamuestras 200  $\mu$ l de anticuerpo contra el CXCR-4 anti-humano de conejo diluido (1:20). El anticuerpo policlonal de CXCR-4 lo preparó Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, CA). Este anticuerpo se hizo contra los 38 primeros aminoácidos de la proteína CXCR-4 (MEGISIYTSNDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANFNK (ID SEC N°:)). Los portamuestras se incubaron durante 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Tras el lavado en PBS, se aplicaron inmunoglobulinas anti conejo conjugadas a FITC (1:20) (DAKO, A/S, Dinamarca) y los portamuestras se incubaron a 24°C durante 30 minutos en cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS y después se mancharon con Hematoxilina (Richard Allen Scientific, Richland MI) durante 30 segundos. Los portamuestras se trataron entonces con un agente clarificante (Richard Allen Scientific, Richland MI) durante 2 segundos y después con un agente de azulado (Richard Allen Scientific, Richland MI). Tras el lavado con agua, los portamuestras se taparon con un cubreobjetos con DABCO al 2% (Sigma, St. Louis MO) en glicerol/PBS al 50% y se visualizaron con un microscopio UV de Zeiss Axioskop.

## 6.2. RESULTADOS

### 6.2.1. IDENTIFICACIÓN DE UN CXCR-4 MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN DIFERENCIAL DE MATRICES DE ADNc HUMANO ATLAS™

La ventaja principal de la técnica de matrices de ADNc humano es que puede analizarse la expresión alterada de un gran número de genes conocidos o desconocidos bajo condiciones biológicas diferentes. Se utilizó la técnica de hibridación diferencial de matriz de expresión del ADNc humano Atlas™ para estudiar las diferencias de expresión génica entre el NBT y el GMTT. Se utilizaron dos membranas de matriz de expresión del ADNc humano Atlas™ EP99916365.2 - PCTUS 99 07431 (Clontech (Palo Alto, CA)), en donde cada membrana contenía ADNc de 588 genes conocidos y 9 genes de mantenimiento. Se hibridó una cantidad igual de ADNc del NBT y del GMTT etiquetados con dCTP32 con dos micromatrices de ADNc humano Atlas™ idénticas. En el GMTT se identificaron varios genes expresados diferencialmente. Uno de estos fue el gen CXCR-4 que está sobreexpresado en el GMTT en comparación con el NBT (Figura 1 A y B). Para confirmar la expresión diferencial de CXCR-4 en el GMTT, se utilizó la técnica RT-PCR específica para genes. Tal y como se muestra en la Figura 3 (paneles C y D), el CXCR-4 está expresado a altos niveles en el GMTT con una expresión baja o inexistente en el NBT. Las condiciones para la RT-PCR se decidieron después de haber utilizado distintas cantidades de plantilla y de variar el número de ciclos de PCR.

### 6.2.2. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN EL GMTT

Para confirmar aún más la expresión diferencial de CXCR-4 en el GMTT, se utilizó la técnica de hibridación in situ para estudiar la expresión de CXCR-4 en ocho GMTT humanos diferentes. Cuatro de las ocho muestras analizadas mostraron altos niveles de expresión de CXCR-4. Uno de esos ejemplos se muestra en la Figura 2. Tras la identificación de CXCR-4, el siguiente paso entendió su función. Para ello, se examinó su expresión en una variedad de tejidos y tipos de células.

### 6.2.3. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN EL GLIOBLASTOMA Y EN OTRAS LÍNEAS CELULARES DE TUMORES CEREBRALES Y TEJIDOS

Dado que el CXCR-4 está sobreexpresado en el tejido de tumores de glioblastoma multiforme, lo siguiente que se hizo fue estudiar su expresión en varias líneas cerebrales derivadas de tumores cerebrales y tejidos primarios de tumores cerebrales. Tal y como se muestra en la Figura 3A, en varias líneas celulares derivadas de tumores cerebrales y en los tejidos primarios de tumores cerebrales se observaron altos niveles de expresión de CXCR-4. Tal y como se muestra en la Figura 3A, se observó un alto nivel de expresión de CXCR-4 en tres líneas celulares de glioblastoma (5GB, HTB-16 y GB1690) adquiridas en ATCC (Rockville, MD). Estas tres líneas celulares se derivaron originariamente de tumores de glioblastoma de pacientes individuales y actualmente están creciendo en número de paso diferentes (5GB=15, HTB-16= y GB1690= 425). El análisis de RT-PCR indicó que el CXCR-4 está sobreexpresado en todas y cada una de estas tres líneas celulares en comparación con los FNHA (Astrocitos Humanos Fetales Normales) y el NBT. Las líneas celulares de glioblastoma HTB-16 y GB 1690 mostraron que el nivel de expresión de CXCR-4 en estas líneas es mucho más alto que en la línea celular 5GB. El análisis de CXCR-4 en otras líneas celulares ha demostrado que se expresa a altos niveles en las líneas celulares de tumores humanos de neuroblastoma y neuroectodérmicos. En las líneas celulares de grado III de meduloblastoma y astrocitoma se

observaron unos niveles de expresión de CXCR-4 moderados (Figura 3B). En los tejidos primarios, se observaron altos niveles de expresión de CXCR-4 en los tumores de glioma y de meningioma (Figura 3C). A la vista de estos resultados, se concluyó que el CXCR-4 está sobreexpresado en tumores humanos de glioma en comparación con el NBT. Recientemente se ha aislado y clonado el ligando de CXCR-4, el SDF-1. Por lo tanto se determinó que este ligando también está sobreexpresado en los tejidos tumorales cerebrales y en las líneas celulares. El SDF-1 se detectó a niveles muy bajos en las células 5GB pero no en la mayoría de las otras líneas celulares. Se observaron altos niveles de expresión del SDF-1 en el tejido del meningioma, glioma maligno y neuroblastoma en comparación con el NBT.

#### 6.2.4. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN TEJIDOS PRIMARIOS Y LÍNEAS CELULARES DE TUMORES DE MAMA

Dado que el gen CXCR-4 está sobreexpresado en tejidos y líneas celulares de tumores cerebrales, se ensayó el patrón de expresión en otros tipos de tumores y líneas celulares. La expresión de CXCR-4 se ensayó en once tejidos primarios mamarios (5 tumores y 6 normales). Tal y como se muestra en la Figura 4A, el CXCR-4 se expresa a altos niveles en tres de los cinco tejidos tumorales mamarios estudiados y a bajos niveles en seis tejidos mamarios normales (véase la Tabla 2 de abajo). Dos de los tres tejidos tumorales mamarios que expresan el gen CXCR-4 fueron positivos para el receptor de estrógeno y de progesterona y uno fue negativo para ambos receptores. El análisis de la expresión indicó que el SDF-1 también está sobreexpresado en los mismos tejidos mamarios en los que estaba sobreexpresado el CXCR-4. Esto puede indicar que la función de CXCR-4 depende del ligando. A continuación se determinó la expresión del gen CXCR-4 en una línea celular normal y en siete líneas celulares de tumor mamario. Tal y como se muestra en la Figura 4B, sólo se observaron altos niveles de expresión de CXCR-4 en una línea celular, la T-47D. Los resultados de este experimento indican que el gen CXCR-4 puede desempeñar un papel importante en la transformación neoplásica del tejido mamario normal.

#### 6.2.5. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS

Los resultados descritos arriba demuestran que el CXCR-4 está sobreexpresado en tejidos cerebrales y mamarios. ¿Está sobreexpresado el gen CXCR-4 en otros tipos de tumores? Para contestar la pregunta de si el CXCR-4 está sobreexpresado en otros tipos de tumores, su expresión se estudió en una variedad de líneas celulares cancerosas a través de la técnica de análisis Northern blot. Tal y como se muestra en la Figura 5A, se observaron altos niveles de expresión de CXCR-4 en la HL-60 de la leucemia promielocítica, la S3 de células HeLa, la MOLT-4 de la leucemia linfoblástica, la Raji del linfoma de Burkitt y bajos niveles en la SW 480 del adenocarcinoma colorrectal (Figura 5A). En la A549 del carcinoma de pulmón G 361 del melanoma y K-562 de la leucemia mielógena se observó una expresión de CXCR-4 baja o nula. Los datos arriba presentados sugieren claramente que el CXCR-4 también está sobreexpresado en muchas líneas celulares tumorales de origen linfocítico.

#### 6.2.6. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN TEJIDOS NORMALES HUMANOS

Para empezar a comprender la función del gen CXCR-4 en la función celular normal, se estudió la expresión del gen CXCR-4 en una gran cantidad de tejidos normales humanos mediante la técnica del análisis de Northern blot. Tal y como se muestra en la Figura 5B, el CXCR-4 sólo se expresó a altos niveles en cuatro órganos (bazo, timo, colon y PBLs). La expresión observada en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, próstata, testículos, ovarios e intestino delgado fue baja o nula.

#### 6.2.7. EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN DISTINTAS REGIONES DEL CEREBRO HUMANO

El gen CXCR-4 se identificó por su característica de expresarse a altos niveles en el GM17 en comparación con el NBT. Para empezar a comprender la función de CXCR-4, se estudió su expresión en distintas regiones del cerebro. Tal y como se muestra en la Figura 6, el lóbulo frontal, el lóbulo temporal y la médula espinal expresan el CXCR-4. La importancia funcional de tal expresión selectiva en estas tres áreas del cerebro no se conoce de momento. Los niveles de expresión de CXCR-4 en estas regiones del cerebro son más bajos que los de los tejidos de origen linfocítico (compare las unidades de expresión relativa en las Figuras 5 y 6).

#### 6.2.8. EXPRESIÓN DE CXCR-4 DURANTE EL DESARROLLO

Se sabe que los genes que están más regulados durante el proceso de tumorigénesis, también están algunas veces sobreexpresados durante las primeras fases del desarrollo. Como primer paso para poder responder a la pregunta de si el CXCR-4 desempeña un papel durante el desarrollo, se estudió su expresión durante las primeras etapas de desarrollo de un ratón.

Antes de proceder con la hibridación in situ de los embriones del ratón, realizamos un análisis de hibridación de animales para demostrar que la secuencia de CXCR-4 se conservaba entre los seres humanos y los ratones. Tal y como se muestra en la Figura 7, el CXCR-4 se conserva entre humano, mono, rata, ratón, perro, vaca y pollo.

Se analizó la expresión de CXCR-4 en ocho etapas de desarrollo de embriones de ratón (día 8 a día 16) mediante la técnica de hibridación in situ. La expresión de CXCR-4 se observó en todos los tejidos del día 8 al 12. El día 14 se observaron altos niveles de expresión en la mayoría de los tejidos y en todas las regiones del cerebro y de la médula ósea. El día 15, la expresión era muy fuerte en la parte delantera y media del cerebro y en la pituitaria. Se

observaron bajos niveles de expresión en la médula ósea, los intestinos y los ovarios. El día 16, la expresión de CXCR-4 estaba prácticamente confinada en el cerebro y en la médula ósea. Los resultados demuestran que el CXCR-4 desempeña muy probablemente alguna función importante durante las primeras etapas del desarrollo.

A la vista de los datos arriba presentados, puede concluirse que el gen CXCR-4 tiene algunas propiedades únicas que quedan reflejadas por su expresión diferencial no sólo en muchos tejidos primarios y líneas celulares tumorales sino también durante el desarrollo embrionario.

## **7. EJEMPLO: EFECTO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CXCR-4 EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA**

Para valorar la función de CXCR-4 en la tumorigénesis cerebral, se examinaron los efectos de la sobreexpresión de CXCR-4 y de la inhibición tanto de la actividad como de la expresión de CXCR-4 en las líneas celulares de glioblastoma.

### **7.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

Véase la Sección 6.1

### **7.2 RESULTADOS**

#### **7.2.1. EXPRESIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE CXCR-4 EN LA LÍNEA CELULAR 5GB**

Para estudiar la función del gen CXCR-4 en la transformación celular, el CXCR-4 se sobreexpresó en las células 5GB en las direcciones de sentido y antisentido. Mediante el uso de lipofectamina (Gibso/BRL) se transfectaron 10 µg aproximadamente de ADN puro sobre dos placas Petri de 60 mm de diámetro que contienen 10.000 células. Las células transfectadas fueron seleccionadas en G418 (1000 µg/ml) durante 2 semanas. Después de 3 semanas, las células se mantuvieron en 400 µg/ml G418. Se observó la morfología celular con el microscopio de luz invertida y se analizaron las propiedades de proliferación celular de la célula transfectada utilizando un kit de proliferaciones celulares no radioactivo de Promega (Madison, WI). No se observó ningún cambio ni en el crecimiento ni en la morfología celulares de las células de glioblastoma transfectadas con el vector pCMV-neo o con CXCR-4 en la dirección en sentido (pCMV-neoCS), pero las células transfectadas con CXCR-4 en una dirección antisentido (pCMV-neoCA) se apreció un elevado crecimiento de las neuritas durante las dos primeras semanas (Figura 9), seguido de la muerte de las células tras algunas semanas. El crecimiento de las neuritas es una característica única de las células sometidas a una diferenciación. Se ha observado el crecimiento de las neuritas y la diferenciación celular de las células de neuroblastoma (LA-N-5HP) en respuesta al ácido retinoico (RA) y a un tratamiento con forskolina (Moore et al. 1996 Clin Exp. Metastasis 14: 239-245). Recientemente ha quedado de manifiesto que el tratamiento de la línea celular de glioblastoma (5GB) con butirato de sodio resulta en la diferenciación celular (Englehard et al., 1997 Neurosurgery 41: 886-897). Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de CXCR-4 en la dirección antisentido bloqueó aún más el gen CXCR-4 en las líneas celulares de glioblastoma 5GB y GB 1690. Este resultado sugiere muy claramente que la expresión de CXCR-4 es requerida para la proliferación continua de células 5GB.

#### **7.2.2 EXPRESIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN DE CXCR-4 EN LAS LÍNEAS CELULARES HTB16 Y GB1690**

Las líneas celulares de glioblastoma HTB16 y GB1690 expresan altos niveles de CXCR-4 en comparación con el NBT y la línea celular 5GB. Estas líneas celulares fueron transfectadas con un vector solo o en la dirección en sentido (pCMV-neo, pCMV-neoCS). Aunque no se observó ningún cambio en la morfología celular, la tasa de proliferación celular fue diferente. Las células GB1690 transfectadas con CXCR-4 en la dirección en sentido resultaron en un rápido aumento en la proliferación celular con las células transfectadas con un vector solamente. Este resultado se repitió cuando las células transfectadas con CXCR-4 en la dirección en sentido pasaron a ser concluyentes mucho más rápido que las células transfectadas solamente con el vector. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de CXCR-4 en GB1690 causa una proliferación rápida de las células. Cuando la célula HTB16 fue transfectada con el gen CXCR-4, se obtuvieron unos resultados similares. En general, las células transfectadas con un CXCR-4 en la dirección en sentido proliferaron a una velocidad un 40% mayor que las células transfectadas sólo con el vector.

#### **7.2.3 FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR SUAVE DE CÉLULAS GB1690 CON COLONIAS SOBREEXPRESIÓN DE CXCR-4**

Tal y como ha quedado demostrado arriba, la sobreexpresión de CXCR-4 en las células HTB-16 y GB1690 resultó en una rápida proliferación celular in vitro. ¿Altera esto a algunos fenotipos in vitro? Para contestar a la pregunta de si la sobreexpresión de CXCR-4 resultaría en una rápida proliferación celular, se realizaron ensayos de formación de colonias en agar suave de células GB1690 que sobreexpresan CXCR-4 en la dirección en sentido. Tal y como se muestra en la Figura 12E, se formaron aproximadamente un 81% más de colonias en las células GB1690 que sobreexpresan un gen CXCR-4 de sentido en comparación a las mismas células transfectadas con el vector pCMV-neo solamente. Las colonias formadas por las células GB1690 con una sobreexpresión de CXCR-4, eran

considerablemente mayores que las transfectadas solamente con cualquiera de los vectores. En base a este resultado, se concluye que la sobreexpresión de CXCR-4 en las células GB1690 causa un aumento en su potencial de transformación celular in vitro.

#### 7.2.4 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE CXCR-4 Y DEL SDFB-1

Se investigó uno de los papeles de CXCR-4 en la proliferación celular transfectando y sobreexpresando primero un ADNc CXCR-4 de longitud completa en tres líneas celulares diferentes del tumor glioblastoma. En las tres líneas celulares se observó una mayor actividad proliferativa y la capacidad de la línea celular GB 1690 de formar colonias en agar suave aumentó considerablemente. Para confirmar el requisito de CXCR-4 y de su ligando SDF 3-1, se estudió a continuación el efecto de unos anticuerpos específicos en la modulación de la proliferación de estas líneas celulares (Figuras 13 y 16). Veinticuatro horas después de la puesta en placas de los cultivos, se añadieron anticuerpos policlonales específicos 5 contra el CXCR-4 o suero preinmune y en dos líneas celulares (GB1690 y 5GB) se inhibió la proliferación celular en un 50% mientras que en la tercera línea, la HTB-16, la proliferación celular se inhibió en un 90% (Figura 13). A continuación se estudió el efecto del anticuerpo monoclonal SDFp-I en la proliferación de las líneas celulares de glioblastoma (Figura 16). El anticuerpo SDF 3-1 causó una inhibición de la proliferación celular de un 90% aproximadamente en tres líneas celulares de glioblastoma (5GB, HTB-16 y GB 1690). Por contra, el tratamiento de las células NIH3T3 con el anticuerpo SDF [3-1 no afectó la proliferación celular. Finalmente, el CXCR-4 se insertó en el vector pCMV-neo en la dirección en sentido y antisentido y fue transfectado en las líneas celulares tumorales de glioblastoma 5GB y GB1690. Durante las dos primeras semanas, en las dos líneas celulares transfectadas con el antisentido CXCR-4 se apreció un elevado crecimiento de las neuritas y una diferenciación celular, mientras que las células transfectadas con el CXCR-4 en sentido o sólo con el vector no mostraron cambio alguno en la morfología (Figura 9). En el análisis inmunocitoquímico quedó de manifiesto que el marcador celular para la diferenciación de células gliales, proteína glial fibrilar asociada (GFAP), se vio fuertemente inducido en las células transfectadas antisentido concomitante con la disminución de la expresión de la proteína del receptor CXCR-4. El crecimiento de las neuritas es una característica típica de las células de diferenciación tales como células de glioblastoma en respuesta al butirato de sodio o células de neuroblastoma en respuesta al ácido retinoico (RA) y a un tratamiento con forskolina. Tres semanas después de la transfección y selección en G418, el total de las 30 células transfectadas con el antisentido CXCR-4 habían sufrido una diferenciación seguida de la muerte de las células. Además, las células transfectadas con el antisentido CXCR-4 fueron incapaces de formar colonias en agar suave (Figura 12). Así, la inhibición de la función celular de CXCR-4 bloqueando su expresión proteica claramente demostró un papel en el mecanismo o mecanismos reguladores de la actividad proliferativa de estos tumores de glioblastoma y posiblemente otros tipos de tumores tales como el adenocarcinoma de mama. Estos resultados también indican que tanto el CXCR-4 como su ligando SDF-1 son necesarios para la proliferación celular de glioblastomas.

La sobreexpresión del receptor CXCR-4 en las células de glioblastomas y adenocarcinomas de mama es un hallazgo sorprendente a la luz de la función definido de CXCR-4 en la entrada del VIH en las células CD4+. Estas observaciones junto con el hallazgo adicional aquí reportado de que la inhibición antisentido de la expresión del receptor CXCR-4 induce la diferenciación celular apoya la tesis de la función del receptor CXCR-4 en el mantenimiento del fenotipo neoplásico. Además, la expresión concomitante del ligando SDF-1 de CXCR-4 por parte de estos cánceres sugiere un papel autocrino/paracrino en la génesis del comportamiento proliferativo aberrante de estos cánceres.

**Tabla 2.**

#### **Sobreexpresión\* de CXCR-4 en tejidos primarios y líneas celulares**

| Tipo de tumor      | Origen           | Nº de tejidos con sobreexpresión de CXCR-4/Nº total de tejidos analizados |
|--------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Tumores cerebrales | Tejido primario  | 11/19                                                                     |
|                    | Líneas celulares | 8/9                                                                       |
| Cerebro normal     | Tejido primario  | 0/10                                                                      |
| Tumores de mama    | Tejido primario  | 3/5                                                                       |
|                    | Líneas celulares | 3/7                                                                       |
| Mama normal        | Tejido primario  | 0/6                                                                       |

\* La sobreexpresión es más del doble y se determina mediante RT-PCR, Southern blots e Hibridaciones in situ.

Tabla 2. Sobreexpresión de CXCR-4 en tejidos tumorales y normales primarios y en líneas celulares. La RT-PCR y el Southern blot específicos al gen se llevaron a cabo utilizando cebadores específicos al CXCR-4 y al DI-2 para estudiar su expresión en el tejido mamario y cerebral primario y en líneas de células. La RT-PCR y el Southern blot se llevaron a cabo usando la metodología arriba descrita. Para estudiar la expresión de CXCR-4 en líneas celulares cancerosas humanas, se adquirieron una línea celular cancerosa y tres hibridaciones de múltiples de tejidos normales humanos (MNHTB) de Clontech (Palo Alto, CA). Estas hibridaciones contenían 2mg de ARNm poliA+ puro. La hibridación se realizó con una sonda CXCR-4 de 0,55 Kb etiquetada mediante el sistema Multiprime (posiciones 1591-1618). A continuación se retiró la sonda CXCR-4 y el gen 3 actina humano se utilizó como control interno. La cuantificación de las Southern y Northern blots se llevó a cabo con el programa de cuantificación de volúmenes ImageQuaNT™ del Molecular Dynamics Phosphor Imager. Con la cuantificación del volumen se calcula el volumen bajo la superficie creado a través de un gráfico en 3-D de las localizaciones de los píxeles y los valores de los píxeles. Se cuantificó el volumen (la intensidad integrada de todos los píxeles del punto excluido el fondo) de las bandas de CXCR-4 en las Southern blots. A continuación, se normalizaron estos valores de los píxeles con los valores de los píxeles de las bandas del gen de mantenimiento (DI-2 o (3 actina) y se mostraron a modo de expresión relativa. Los experimentos se llevaron a cabo dos veces y a una expresión de CXCR-4 en el tumor en comparación con el NBT dos veces mayor o más fue considerado como sobreexpresión. Ocho de los diecinueve tejidos quirúrgicos del glioblastoma cerebral humano se analizaron mediante la técnica de hibridación in situ.

#### 8. EJEMPLO: OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DE CXCR-4

Según la presente invención, pueden desarrollarse oligonucleótidos fosforotioatos antisentido para inhibir la expresión de CXCR-4. En pocas palabras, pueden adquirirse en el mercado seis oligodesoxinucleótidos fosforotioato (ODN) contra el punto de iniciación traslacional y tres ODN aleatorios, por ejemplo, en Oligos Etc. Inc. (Wilsonville, OR). El análisis del efecto de los ODN en la inhibición de la expresión de CXCR-4 se realiza según la metodología descrita anteriormente (Broadus et al., 1997, Neurosurgery 42:908-915). En resumen, en unas placas de 96 pozos se colocan 1000 células HTB-16 y GB1690 por pozo en medios sin ODN. Veinticuatro horas más tarde, el medio de cultivo se cambia de modo que tenga una concentración final de 1mmol/L, 3mmol/L o 10mmol/L de ODN. Los cultivos de control reciben medios de cultivo nuevos sin ODN añadidos. Pasados 4 ó 5 días, se analiza la proliferación celular utilizando un kit de ensayo de proliferaciones celulares de Promega (Madison, WI). Para estudiar el efecto de los ODN en la expresión de CXCR-4, se colocan células HTB-16 y GB1690 en portamuestras con cámaras de vidrio. La expresión se analiza a través de los métodos de inmunocitoquímica arriba descritos. Una vez determinada la concentración de ODN necesaria para inhibir la expresión de CXCR-4, se realizan análisis RT-PCR, Northern y Western blot en las células tratadas con ODN. Se analizan las curvas de crecimiento y la formación de colonias en agar suave de las células que sobreexpresa y que subexpresan el gen CXCR-4.

EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO QUE PUEDEN SER UTILIZADOS CONFORME A LA PRESENTE INVENCION

|                                                                   |        |
|-------------------------------------------------------------------|--------|
| 5'GCCACCGCATCTGGAGAACCAGCGGTTACCATGGAGGGGATCCAGTATATACACTTCAGAT3' | CXCR-4 |
| 3'CGGTGGCGTAGACCTCTTGG5'                                          | OL-1   |
| 25 3,CCAATGGTACCTCCCCTAG5'                                        | OL-2   |
| 3'GGTCATATATGTGAAGTCTA5'                                          | OL-3   |
| 5'ACTAGAGATACAGATCATAT3'                                          | OL-4   |
| 5'CATATACGATCGATCGATGC3'                                          |        |
| 5'GATAGTGCTGATCGATGCTA3'                                          |        |

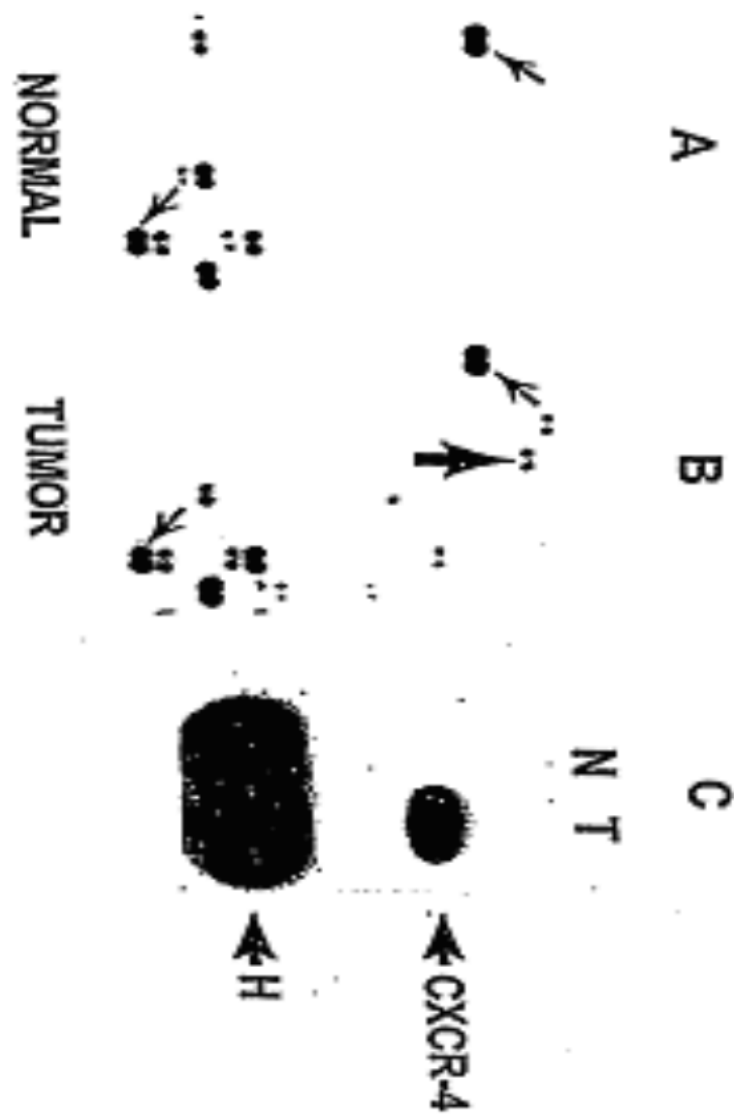
El alcance de la presente invención no se ve limitado ni por el microorganismo depositado ni por las realizaciones específicas descritas aquí dentro. De hecho, aquellos versados en la técnica comprenderán que son posibles varias modificaciones de la invención, a parte de las descritas aquí dentro, a partir de la descripción anterior y las figuras que la acompañan. Tales modificaciones deben ser consideradas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

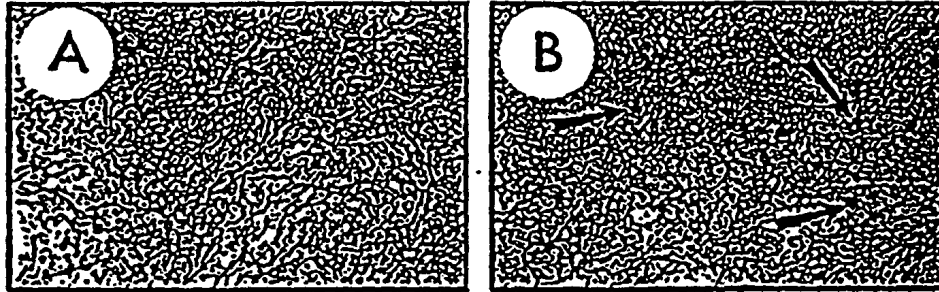
1.Una molécula que inhibe la función de CXCR-4 para uso en el tratamiento y la prevención de transformación y tumorigénesis, caracterizada por sobreexpresión de CXCR-4, en mamíferos, en donde la molécula que inhibe la función de CXCR-4 comprende:

- 5 un anticuerpo anti-CXCR-4 o un fragmento del mismo de unión a antígenos,  
un ácido nucleico antisentido CXCR-4,  
un ácido nucleico complementario a la secuencia de nucleótidos de CXCR-4, que inhibe la expresión génica de CXCR-4, en donde el ácido nucleico es una ribozima o una molécula de triple hélice complementaria a al menos una porción de un transcrito de ARN del gen CXCR-4, o un ácido nucleico que comprende al menos una porción de un gen CXCR-4 en el que se ha insertado un nucleótido heterólogo para inactivar la actividad biológica del gen CXCR-4, flanqueando la porción de CXCR-4 el nucleótido heterólogo para promover una recombinación homóloga con un gen CXCR-4 genómico.
- 10 2.La molécula según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo específico para CXCR-4 es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena simple, o un anticuerpo biespecífico, y el fragmento de unión a antígenos es un fragmento de dicho anticuerpo.
- 15 3.La molécula según la reivindicación 2, en donde el fragmento del anticuerpo comprende un fragmento Fab, a F(ab')<sub>2</sub>, o Fv.
- 4.La molécula según la reivindicación 2 ó 3, en donde el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo está conjugado a un ión radiactivo o a una fracción de un fármaco terapéutico.
- 20 5.La molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la transformación y tumorigénesis caracterizada por una sobreexpresión de CXCR-4 se produce en células cerebrales o mamarias.
- 6.La molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la tumorigénesis caracterizada por una sobreexpresión de CXCR-4 comprende una proliferación celular aberrante, transformación celular, un tumor maligno, una progresión a un estado neoplásico, o un cambio disproliferativo.
- 25 7.La molécula según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es un nucleótido que comprende una estructura antisentido correspondiente a todo el ARNm de CXCR-4, la secuencia de nucleótidos 5'-GGTTCTCCAGATGCGGTGGC-3' (ID SEC N°: 23), la secuencia de nucleótidos 5'-GATCCCCTCCATGGT AACC-3' (ID SEC N°: 24), la secuencia de nucleótidos 5'-ATCTGAAGTGTATATACTGG-3' (ID SEC N°: 25), la secuencia de nucleótidos 5'-ACTAGAGATACAGATCATAT-3' (ID SEC N°: 26), la secuencia de nucleótidos 5'-CATATACGAT CGATCGATGC-3' (ID SEC N°: 27), o la secuencia de nucleótidos 5'-GATAGTGCTGATCGATGCTA-3' (ID SEC N°: 28).
- 30 8.Un método de detección de un fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso en una muestra derivada de un primer sujeto resultante de una expresión aberrante de CXCR-4 mediante la determinación y comparación del nivel de ARN o proteína de CXCR-4 en la muestra con el nivel de ARN o proteína de CXCR-4 RNA en una muestra análoga derivada de una porción del cuerpo o de un segundo sujeto que no tiene el fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso, en donde unos niveles aumentados de ARN o proteína de CXCR-4 en la muestra derivada del primer sujeto respecto a la muestra análoga derivada de una porción del cuerpo o de un segundo sujeto que no tiene el fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso, indica la presencia de un fenotipo celular transformado, precanceroso o canceroso en el primer sujeto.
- 35 9.El método según la reivindicación 8, en donde el nivel aberrante de ARN CXCR-4 se determina utilizando una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a al menos una porción del ARN CXCR-4.
- 10.El método según la reivindicación 8, en donde el nivel aberrante de proteína CXCR-4 se determina utilizando un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígenos del mismo, específico para el CXCR-4 sobre la superficie de la célula cancerosa o de la célula precancerosa.
- 40 11.El método según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo específico al CXCR-4 es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena simple, o un anticuerpo biespecífico, y el fragmento de unión a antígenos es un fragmento de dicho anticuerpo.
- 12.La molécula según la reivindicación 11, en donde el fragmento del anticuerpo comprende un fragmento Fab, a F(ab')<sub>2</sub>, o Fv.
- 45 13.El método según la reivindicación 10, 11 ó 12, en donde el anticuerpo se conjuga a un ión radiactivo o a una fracción de un fármaco terapéutico.
- 50

14. Un método de diagnóstico o cribado de la presencia de o predisposición a un tumor en una muestra derivada de un sujeto, que comprende
- 5 detectar la sobreexpresión de ARN CXCR-4, o proteína respecto al nivel de ARN CXCR-4, o proteína presente en una muestra análoga de una porción del cuerpo o de un sujeto que no tiene la presencia de o predisposición a dicho tumor,
- en donde la presencia de dicho ARN o proteína de CXCR-4 sobreexpresados indica la presencia del tumor o una predisposición al desarrollo del tumor.
15. El método según la reivindicación 14, en donde el nivel aberrante de ARN CXCR-4 se determina utilizando una molécula de ácido nucleico complementaria a al menos una porción del ARN CXCR-4.
- 10 16. El método según la reivindicación 14, en donde el nivel aberrante de proteína CXCR-4 se determina utilizando un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígenos del mismo, específico para el CXCR-4 sobre la superficie de la célula tumoral o de la célula precancerosa.
17. El método según la reivindicación 16, en donde el anticuerpo específico para el dominio extracelular de CXCR-4 es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena simple, o
- 15 un anticuerpo biespecífico, y el fragmento de unión a antígenos es un fragmento de dicho anticuerpo.
18. La molécula según la reivindicación 16, en donde el fragmento del anticuerpo comprende un fragmento Fab, a F(ab')<sub>2</sub>, o Fv.
19. El método según la reivindicación 16, 17 o 18, en donde el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable.
20. El método según la reivindicación 19, en donde el marcador detectable es una fracción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente o radioactiva.
- 20



FIGURAS 1A-C



**FIGURAS 2A-B**

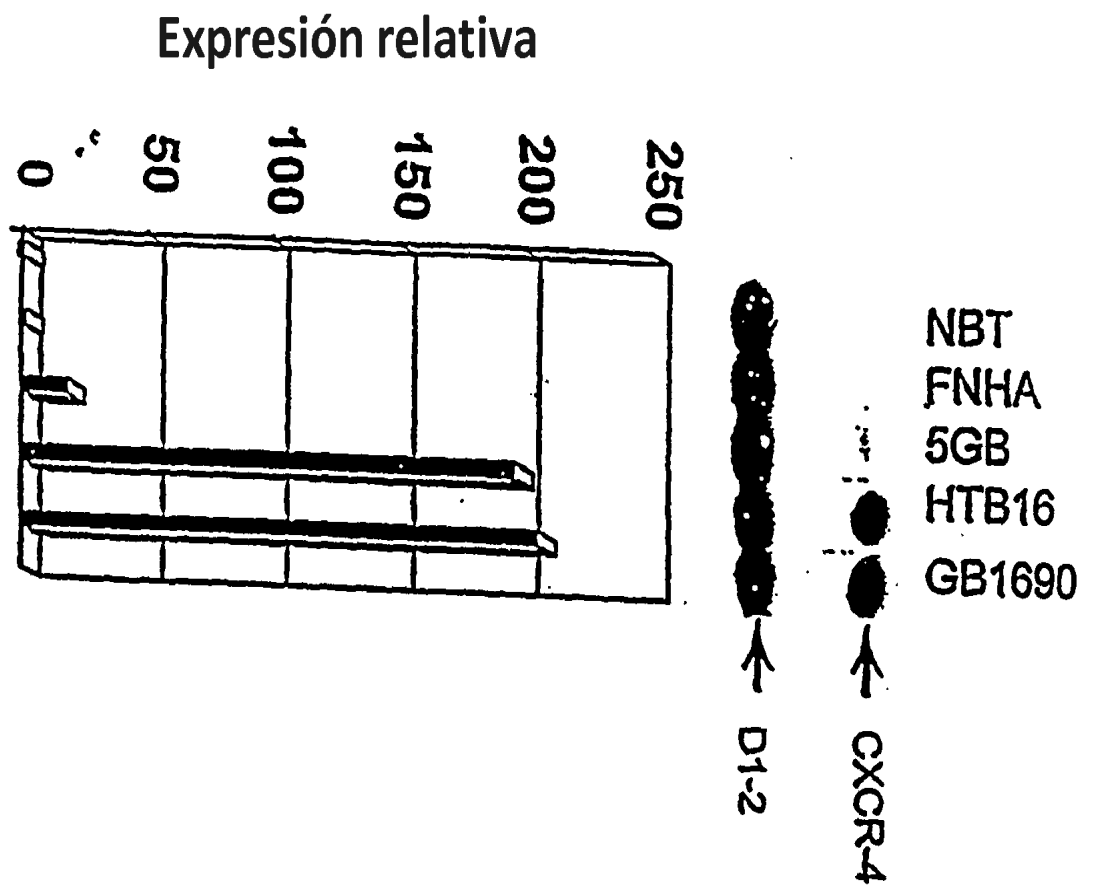
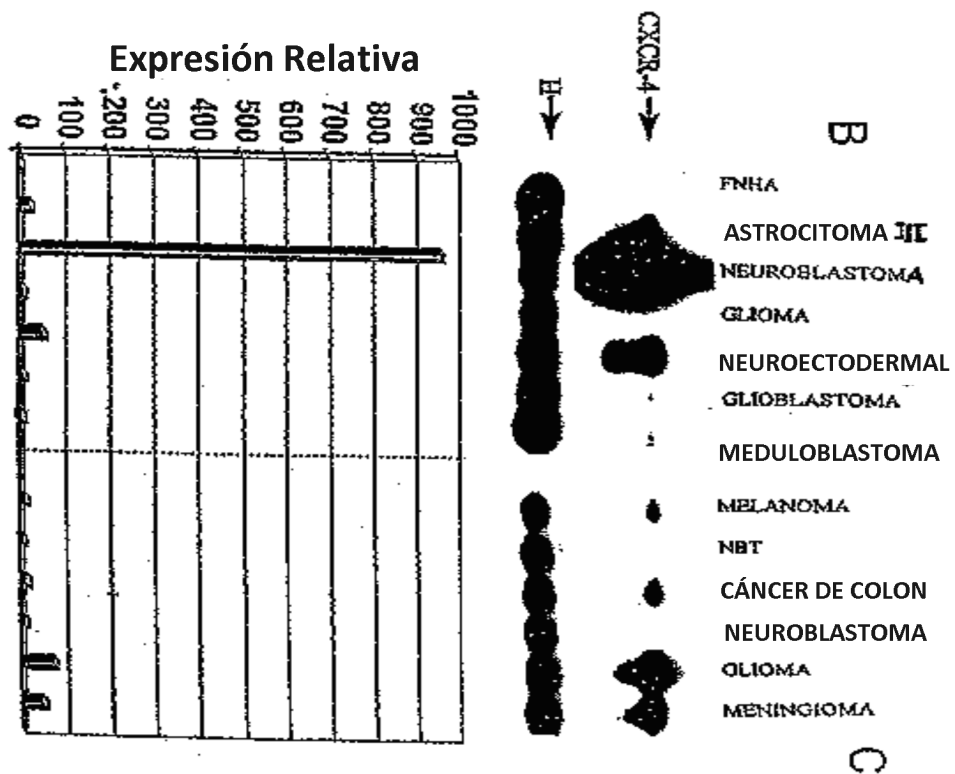
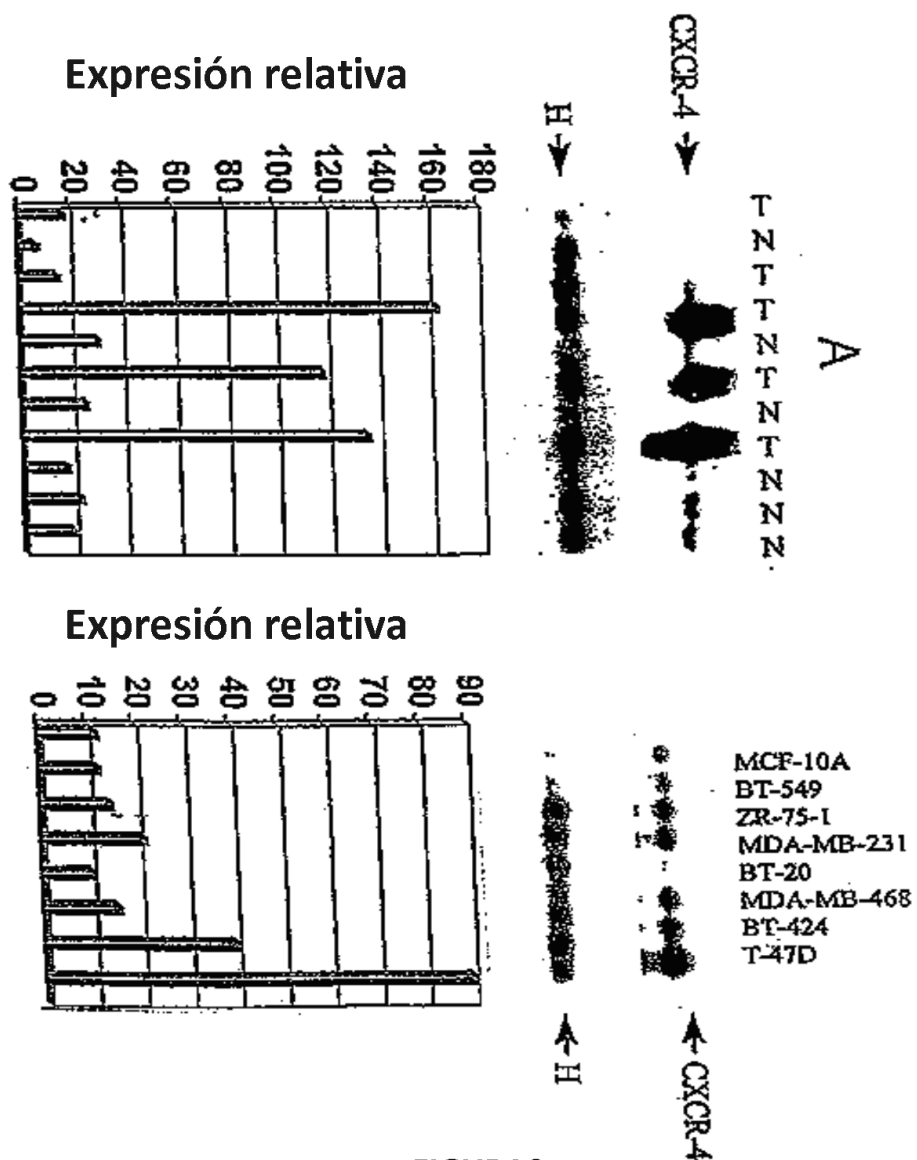


FIGURA 3A



FIGURAS 3B-C



FIGURAS 4A-B

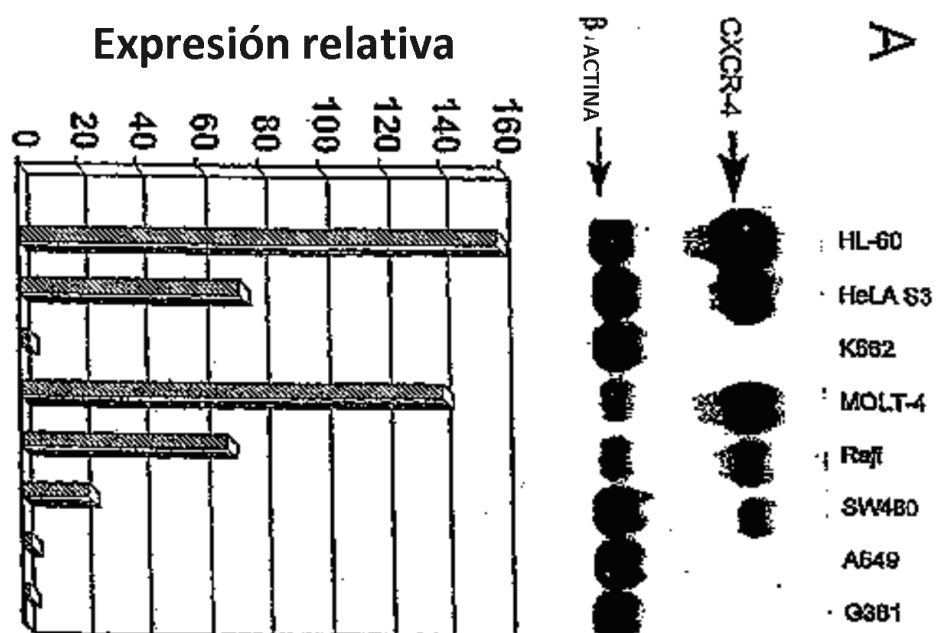


FIGURA 5A

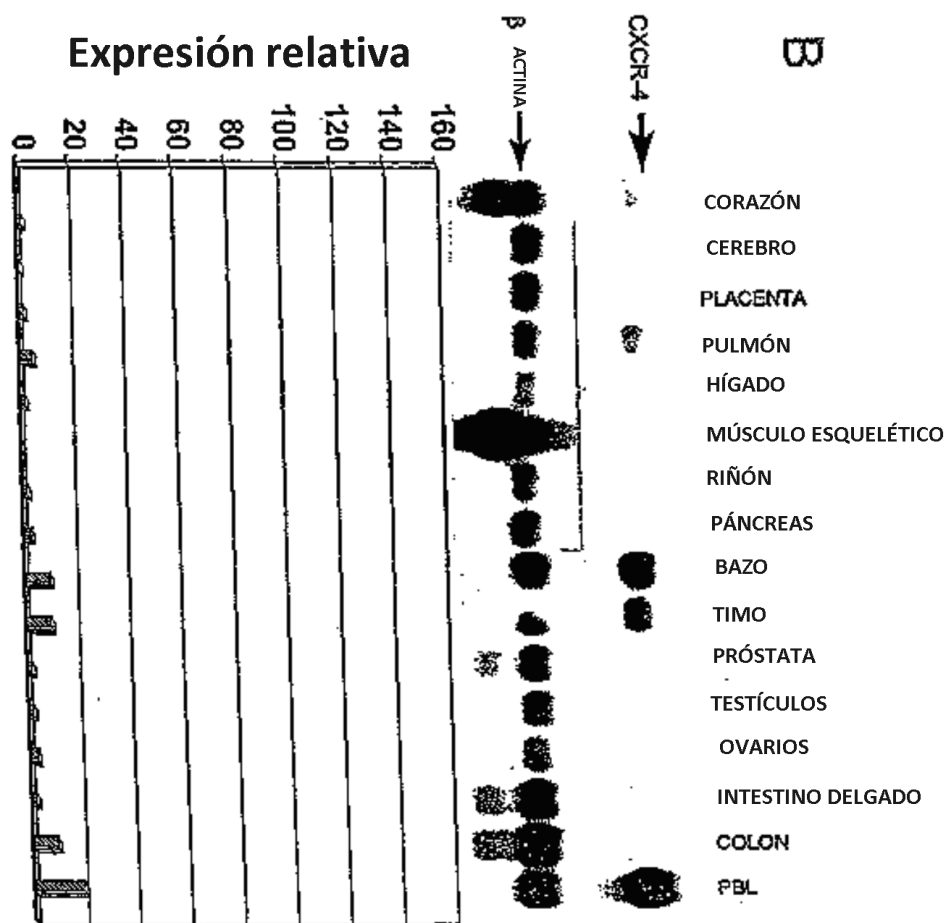


FIGURA 5B

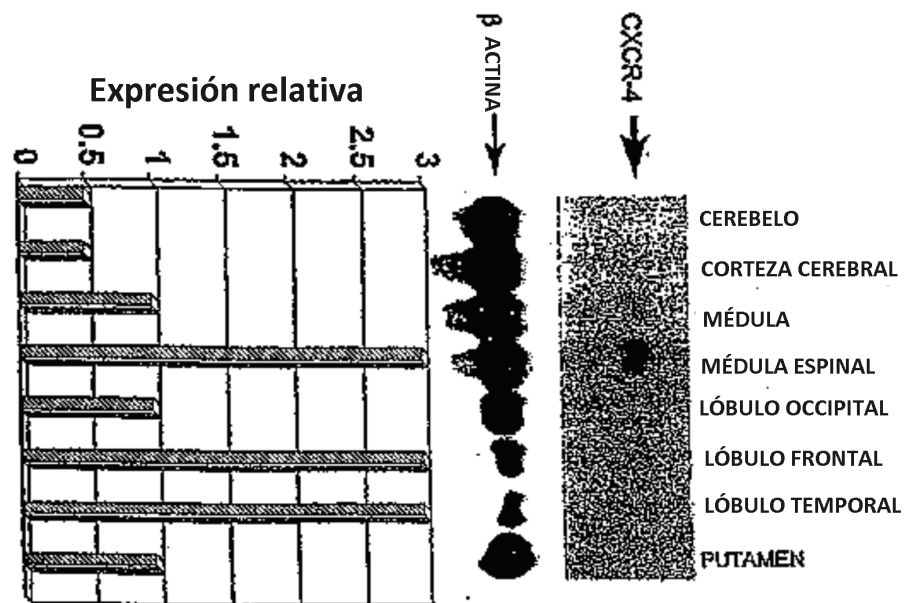
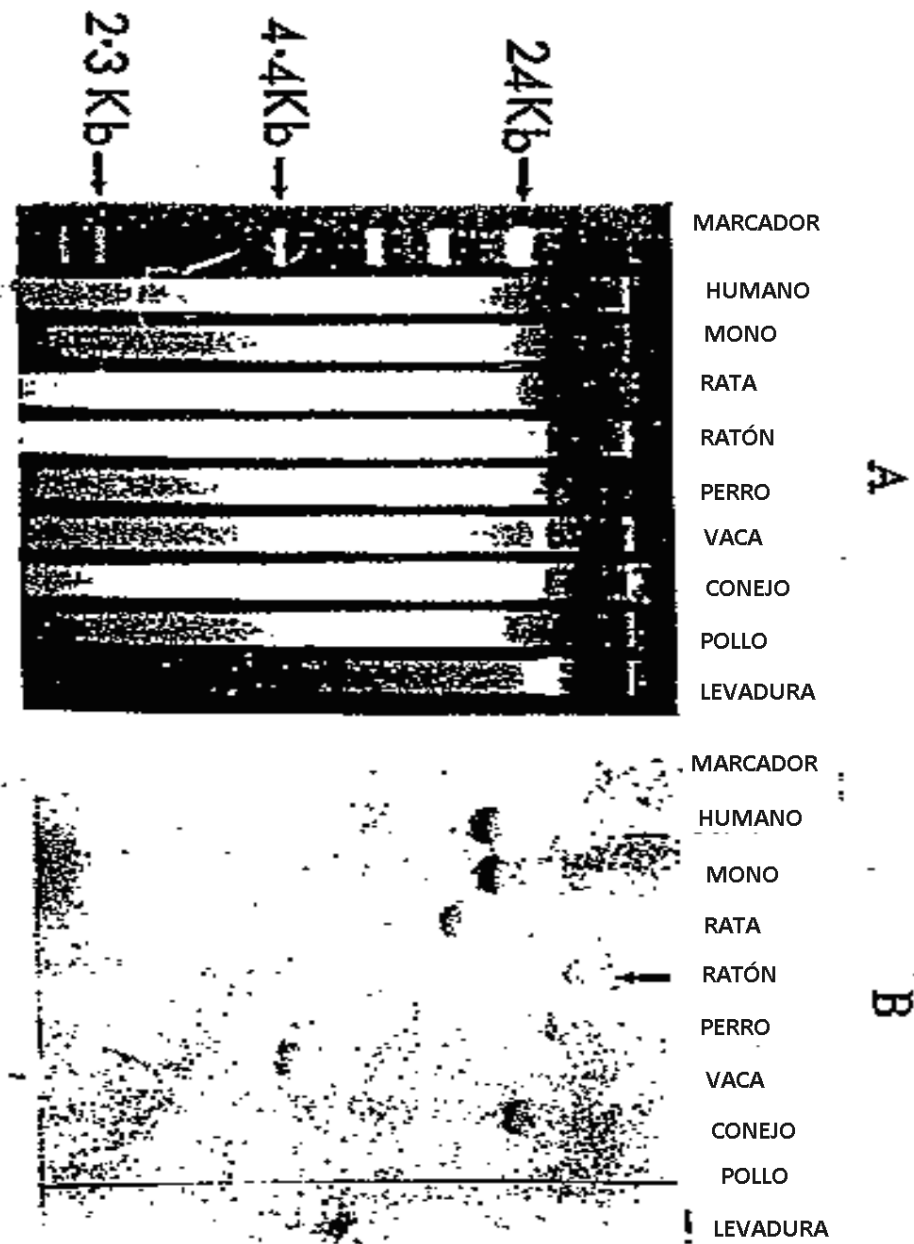


FIGURA 6



FIGURAS 7A-B

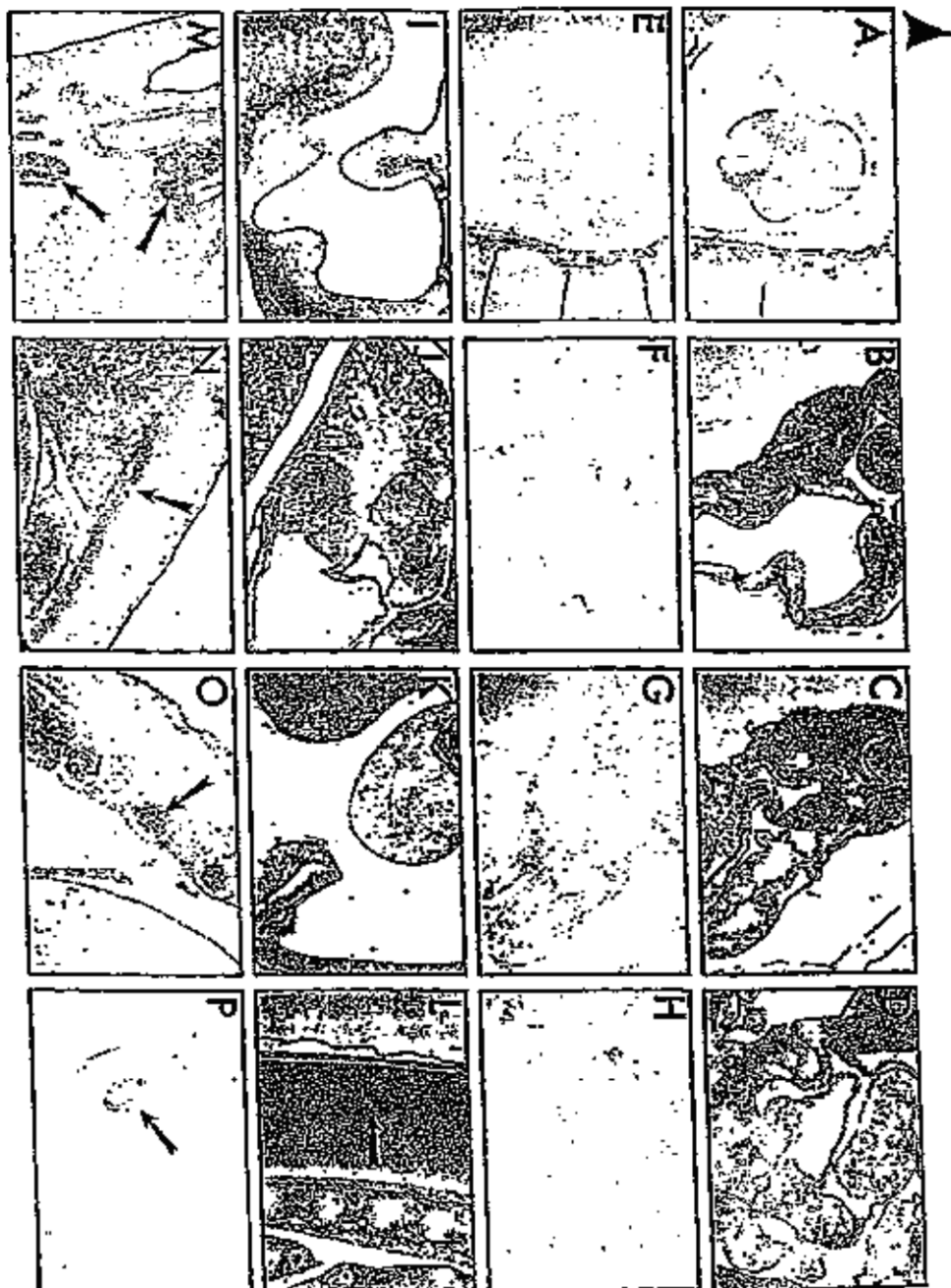
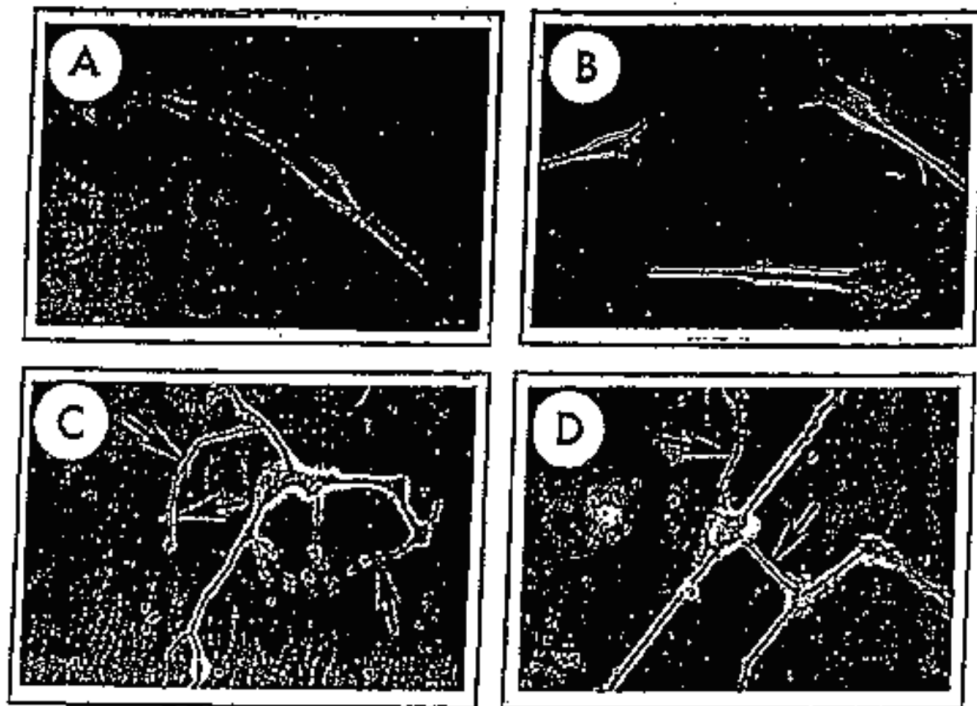


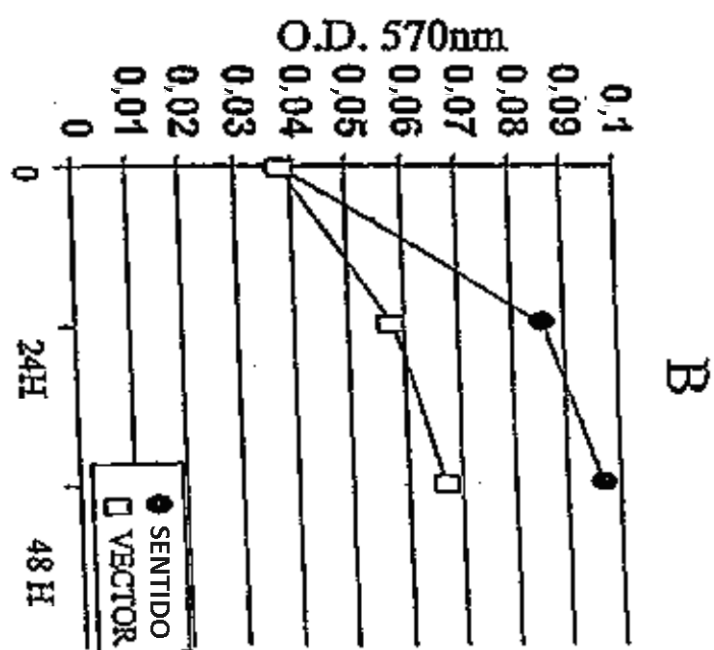
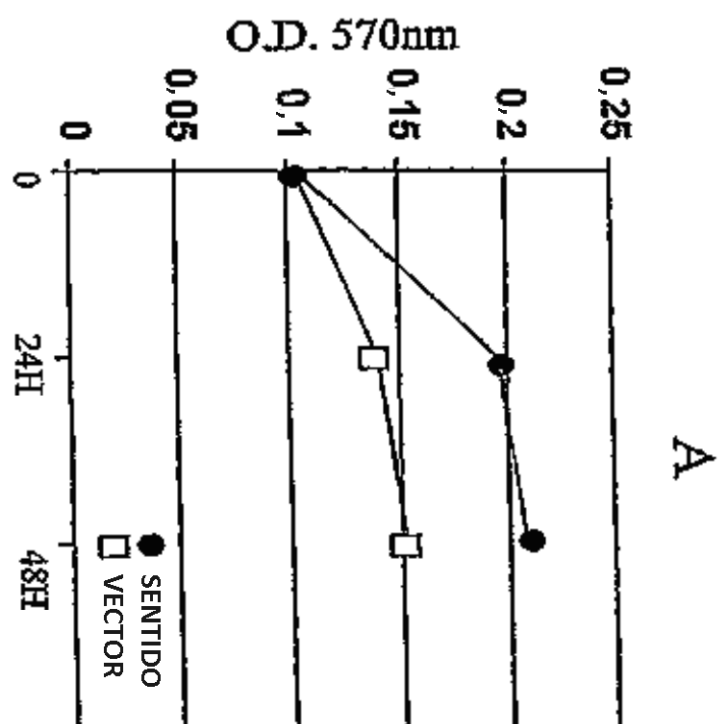
FIGURA 8



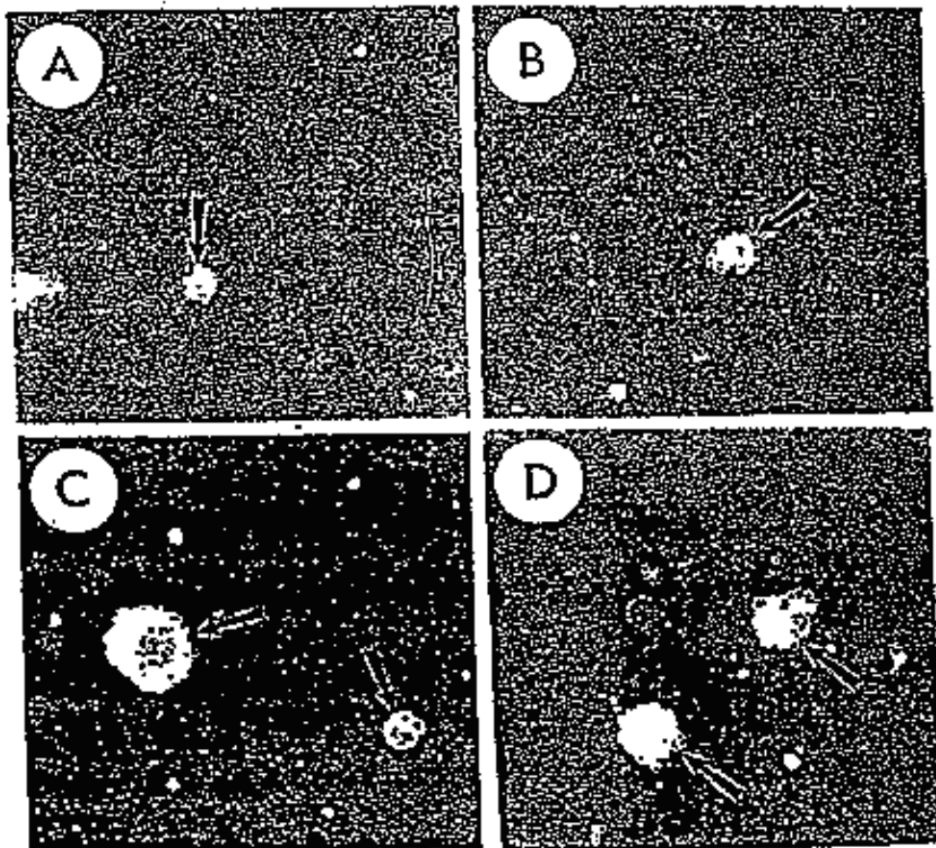
FIGURAS 9A-D



**FIGURAS 10A-C**



FIGURAS 11A-B



FIGURAS 12A-D

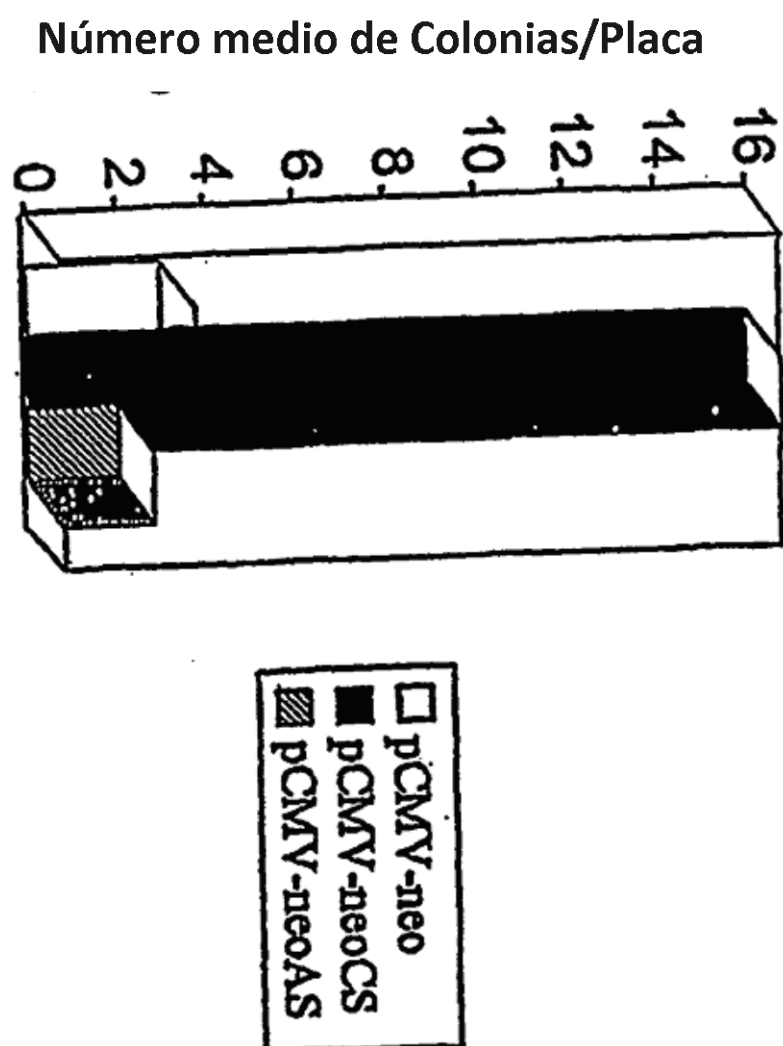


FIGURA 12E

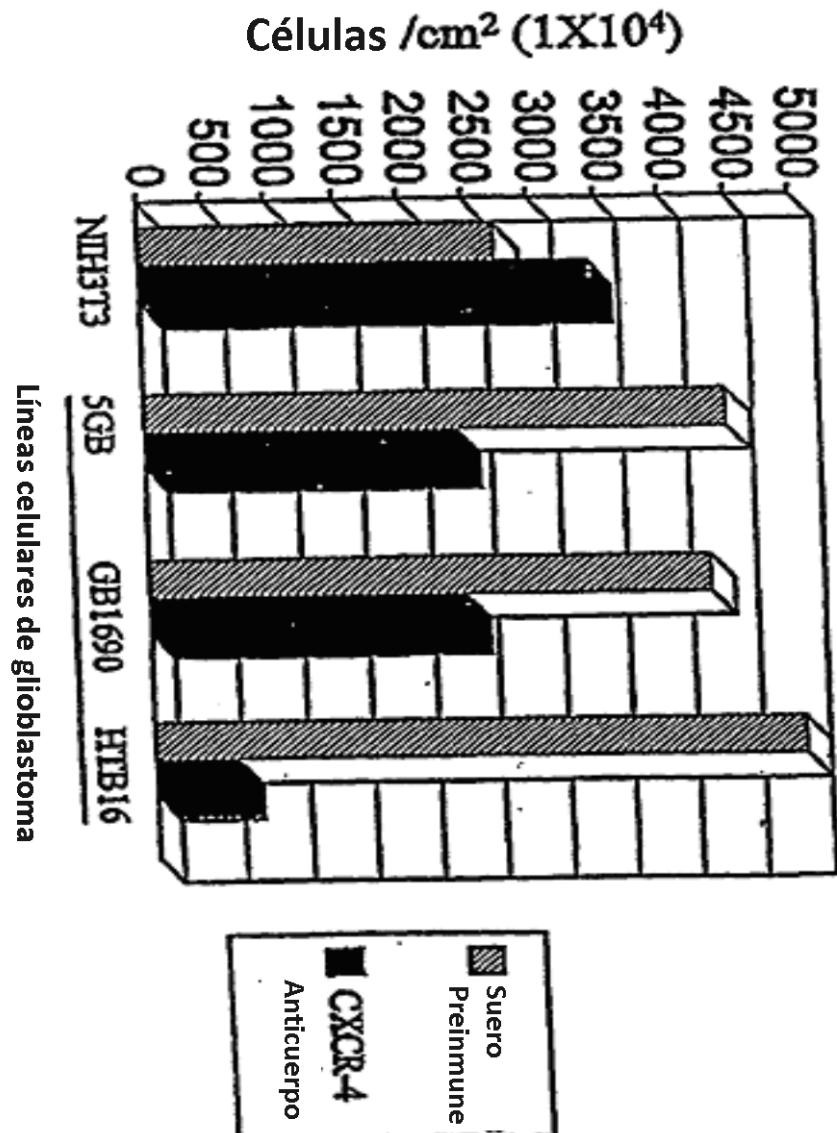


FIGURA 13

|                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATG GAG GGG ATC AOT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA ATG<br>Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met<br>1 5 10 15 48    |
| GGC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT TTC CGT GAA GAA<br>Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu<br>20 25 30 96     |
| AAT GGT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC<br>Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile<br>35 40 45 144    |
| TTC TTA ACT GGC ATT GTC GGC AAT GGA TTG GTC ATC CTG GTC ATG GGT<br>Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly<br>50 55 60 192    |
| TAC CAG AAG AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG TAC AAG CTG CAC CTG<br>Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu<br>65 70 75 80 240 |
| TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG GTT CCC TTC TGG GCA GTT<br>Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val<br>85 90 95 288    |
| GAT GGC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG AAC TTC CTA TGC AAG GCA GTC<br>Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val<br>100 105 110 336 |
| CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC CTC TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC<br>His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala<br>115 120 125 384 |
| TTC ATC AGT CTG GAC CGC TAC CTG GGC ATC GTC CAC GGC ACC AAC AGT<br>Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser<br>130 135 140 432 |
| CAG AGG CCA AGG AAG CTG TTG GGT GAA AAG GAG GTC TAT GTT GGC GTC<br>Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val<br>145 150 155 480 |
| TGC ATC COT GGC CTC CTG CTG ACT ATT CCG GAC TTC ATC TTT GGC AAC<br>Trp Ile Pro Ala Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn<br>165 170 175 528     |
| CTC AOT GAG GCA GAT GAC AGA TAT ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT<br>Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn<br>180 185 190 576 |
| GAC TTG TGG GTG GTT GTG TTC CAG TTT CAG GAC ATC ATG GTT GGC CTT<br>Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu<br>195 200 205 624 |
| ATC CTG COT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC TCC<br>Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser<br>210 215 220 672 |
| AAG CTG TCA GAC TCC AAG GGC CAC CAG AAG CGC AAG GGC CTC AAG ACC<br>Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr<br>225 230 235 720 |
| ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC TTC GGC TGT TGG CTG COT TAC TAC<br>Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr<br>245 250 255 768 |
| ATT GGG ATC AGC ATC GAC TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC AAG CAA<br>Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln<br>260 265 270 816 |

FIGURA 14

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| GCG | TGT | GAG | TTT | GAG | AAC | ACT | GTC | CAC | AAG | TGG | ATT | TCC | ATC | ACC | GAG | 864  |
| Gly | Cys | Glu | Phe | Glu | Asn | Thr | Val | His | Lys | Trp | Ile | Ser | Ile | Thr | Glu |      |
|     | 276 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 286 |     |     |     |      |
| GCC | CTA | GCT | TTC | TTC | CAC | TGT | TGT | CTG | AAC | CCG | ATC | CTC | TAT | GCT | TTC | 912  |
| Ala | Leu | Ala | Phe | Phe | His | Cys | Cys | Leu | Asn | Pro | Ile | Leu | Tyr | Ala | Phe |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| CTT | GGA | GCC | AAA | TTT | AAA | ACC | TCT | GCC | CAG | CAC | GCA | CTC | ACC | TCT | GTC | 960  |
| Leu | Gly | Ala | Lys | Phe | Lys | Thr | Ser | Ala | Gln | His | Ala | Leu | Thr | Ser | Val |      |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| AGC | AGA | GGG | TCC | ACC | CTC | AAG | ATC | CTC | TCC | AAA | GGA | AAG | CGA | GTT | GGA | 1008 |
| Ser | Arg | Gly | Ser | Ser | Leu | Lys | Ile | Leu | Ser | Lys | Gly | Lys | Arg | Gly | Gly |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 336 |     |      |
| CAT | TCA | TCT | GTT | TCC | ACT | GAG | TCT | GAG | TCT | TCA | AGT | TTT | CAC | TCC | AGC | T    |
| His | Ser | Ser | Val | Ser | Thr | Glu | Ser | Glu | Ser | Ser | Ser | Phe | His | Ser | Ser |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| AA  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1059 |

FIGURA 14 (cont.)

|             |             |                 |             |                 |             |      |
|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------|
| TCTCCCTCAG  | CCGCAATTGCC | CGCTGGGGT       | CGGGCCCCCG  | ACCCGTGCTC      | GTCGCCCCGC  | 60   |
| CCGCCCCGCC  | GGCCGGGCC   | ATG AAC GCC     | AAG GTC GTG | GTC GTG CTC     | GTC CTC     | 112  |
|             |             | Met Asn Ala Lys | Val Val Val | Val Leu Val Leu |             |      |
|             |             | 1               | 5           | 10              |             |      |
| GTG CTG ACC | GCG CTC TGC | CTC AGC         | GAC GGG     | AAG CCC         | GTC AGC     | 160  |
| Val Leu Thr | Ala Leu Cys | Leu Ser         | Asp Gly     | Lys Pro         | Val Ser     |      |
|             | 15          | 20              | 25          |                 |             |      |
| TAC AGA TGC | CCA TGC CGA | TTC TTC         | GAA AGC     | CAT GTT         | GCC AGA     | 208  |
| Tyr Arg Cys | Pro Cys Arg | Phe Phe         | Glu Ser     | His Val         | Ala Arg     |      |
|             | 30          | 35              | 40          |                 |             |      |
| GTC AAG CAT | CTC AAA ATT | CTC AAC         | ACT CCA     | AAC TGT         | GCC CTT     | 256  |
| Val Lys His | Leu Lys Ile | Leu Asn         | Thr Pro     | Asn Cys         | Ala Leu     |      |
|             | 45          | 50              | 55          |                 |             |      |
| GTA GCC CCG | CTG AAG AAC | AAC AAC         | AGA CAA     | GTG TGC         | ATT GAC     | 304  |
| Val Ala Arg | Leu Lys Asn | Asn Asn         | Arg Gln     | Val Cys         | Ile Asp     |      |
|             | 60          | 65              | 70          |                 |             |      |
| CTA AAG TGG | ATT CAG GAG | TAC CTG         | GAG AAA     | GCT TTA         | AAC AAG     | 355  |
| Leu Lys Trp | Ile Gln     | Glu Tyr         | Leu Glu     | Lys Ala         | Leu Asn     |      |
|             | 80          | 85              |             |                 |             |      |
| CAGCCAAAA   | GGACTTTCCG  | CTAGACCCAC      | TCGAGGAAAA  | CTAAAACCTT      | GTGAGAGATG  | 415  |
| AAAGGGCAAA  | GACGTGGGGG  | AGGGGGGCTT      | AACCATGAGG  | ACCAGGTGTG      | TGTGTGGGGT  | 475  |
| GGGCACATTG  | ATCTGGGATC  | GGGCGTGAGG      | TTTGACGAT   | TTAGACCCCT      | CATTATATAGC | 535  |
| ATACGGTATG  | ATATTGCAGC  | TTATATTGAT      | CCATGCCCTG  | TACCTGTGCA      | CGTTGGMACT  | 595  |
| TTTATTACTG  | GGGTTTTTCT  | AAGAAAGAAA      | TTGTATTATC  | AACAGCATT       | TCAAGCAGTT  | 655  |
| AGTTCCCTCA  | TGATCATCAC  | AATCATCATC      | ATTCTCATTC  | TCATTTTTTA      | AATCAACGAG  | 715  |
| TACTTCAGAG  | TCTGAATTTC  | GCTTGTTTTC      | AGCATCTCTT  | CTGCTCCCTT      | GGGGAGTGTG  | 775  |
| GGCAGAGTCA  | GGTGGTGGCT  | TAAACGGGAG      | CTGGAAAAAG  | TGTCTTTTCT      | TGAGACACTG  | 835  |
| AGGCTCCCGC  | AGCAGCGGCC  | CTCCCAAGAG      | GAAGGCCTCT  | GTGGCACTCA      | GATACCGACT  | 895  |
| GGGGCTGGGG  | CGCGGCCACT  | GCCCTCAOCT      | CCCTTTTCAA  | ACCTCAGTCA      | TGGGCTCTGT  | 955  |
| GGGCTCCATG  | TAGAAGCCAC  | TATTAATGCG      | ACTGTCTCAG  | AGACCCCTCT      | CCAGGCTATT  | 1015 |
| OCTACTCTCT  | CCCGAATCC   | GAGAGCATGC      | TTAATCTTGC  | TTCTGCTTCT      | CATTTCTGTA  | 1075 |
| GCTGTGATCG  | CGCGCAOCCA  | GGGGGAAGA       | GGGTGATTCG  | TGGGGCTGTG      | GGCCTGCTATC | 1135 |
| CCTCTCCTCC  | CAGGCGCTGC  | CCACAGCTC       | GGGCGCTCTG  | TGAGATCCGT      | CTTTGGGCTC  | 1195 |
| CTCAGAAATG  | GAGCTGGGCC  | TCTCCTGGGG      | ATGTGTAAATG | GTCCCGCTGC      | TTACCGGCA   | 1255 |
| AAGACAAGTC  | TTACAGAAT   | CAATGCAAT       | TTAAATCTG   | AGAGCTCGCT      | TGAGTGACTG  | 1315 |
| GGTTTGTGAT  | TGCTCTGAA   | GCCTATGAT       | GGCATGGAGG  | CACTAACABA      | CTCTGAGGTT  | 1375 |
| TCGAAATCA   | GAAGCGAAAA  | AATCAGTGAA      | TAAACCATCA  | TCTTGCCACT      | ACCCCTCTCT  | 1435 |
| GAAGOCACAG  | CAGGGGTTC   | GCTTCCATC       | AGAACTGTTG  | GCAAGGTGAC      | ATTTGCATGC  | 1495 |
| ATAGATGCGA  | TCACAGAAAG  | GTCCTGGTGG      | TATTTGTAA   | TTTTTGCAAG      | GCATTTTTTT  | 1555 |
| ATATATATTT  | TGTGACAT    | TTTTTTTAC       | GATTCCTTAG  | AAAACAAATG      | TATTTCAAAA  | 1615 |
| TATATTATA   | GTCGAACAG   | TCTATATAT       | GATGAGAGC   | CATATGAATG      | TCAGTAGTTT  | 1675 |
| TACTTCTCT   | ATTATCTCA   | ACTACTGGCA      | ATTTGTAAAG  | AAATATATAT      | GATATATATA  | 1735 |
| TGTGATTOCA  | GCTTTTCAAT  | GTTAGCCACA      | GTGTATTTTT  | TCACTGTATC      | TAAATTTGTA  | 1795 |
| TCAAATGTGA  | CATTATATGC  | ACTAGCAATA      | AAATGCTAAT  | TGTTTCATGG      | TA          | 1847 |

FIGURA 15

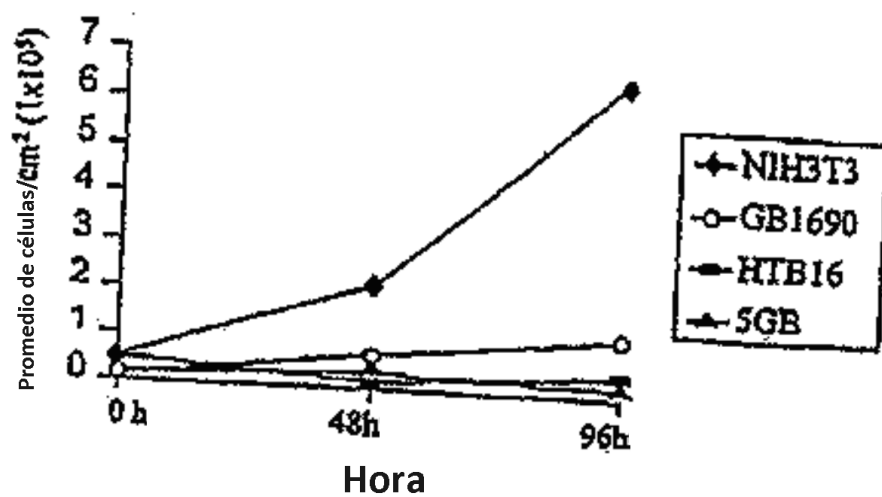


FIGURA 16