

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 922**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2008 E 08772549 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2176295**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD79b humanizados e inmunoconjugados y métodos de uso**

30 Prioridad:

16.07.2007 US 950088 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.02.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, YVONNE;
DENNIS, MARK;
ELKINS, KRISTI;
JUNUTULA, JAGATH REDDY;
POLSON, ANDREW y
ZHENG, BING**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 528 922 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD79b humanizados e inmunoconjugados y métodos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de material útiles para el tratamiento de un tumor hematopoyético en mamíferos y a métodos de utilización de estas composiciones de materia para el mismo.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los tumores malignos (cáncer) son la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, después de las enfermedades del corazón (Boring et al., CA Cancer J Clin., 43:7 [(1993)]. El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta nódulos linfáticos regionales y hasta puntos distantes a través de un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que no crecerían células normales. El cáncer se manifiesta en una gran variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

[0003] Los cánceres que implican células generadas durante la hematopoyesis, un proceso mediante el cual se generan elementos celulares de la sangre, tales como linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células "killers" naturales, se refieren como cánceres hematopoyéticos. Los linfocitos que se pueden encontrar en la sangre y el tejido linfático y que son críticos para la respuesta inmune se clasifican en dos clases principales de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T), que median en la inmunidad humoral y medida por células, respectivamente.

[0004] Las células B maduran en la médula ósea y dejan que la médula exprese un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B intacta encuentra primero el antígeno para el que su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula empieza a dividirse rápidamente y su progenie a diferenciarse en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una esperanza de vida más larga y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parenteral original. Las células plasmáticas no producen el anticuerpo unido a membrana, pero en cambio producen el anticuerpo en una forma que se puede secretar. Los anticuerpos secretados son la molécula efectora principal de la inmunidad humoral.

[0005] Los trastornos relacionados con células B incluyen, pero sin limitación, linfoma maligno (linfoma no de Hodgkin, NHL), mieloma múltiple (MM) y leucemia linfocítica crónica (CLL, leucemia de células B (linfocitos CD5+ B)). Los linfomas no de Hodgkin (NHL), un grupo heterogéneo de cánceres que aparecen principalmente de linfocitos B, representan aproximadamente el 4% de los nuevos cánceres diagnosticados (Jemal, A. et al., CA-Cancer J Clin., 52: 23-47 (2002)). Los NHL agresivos comprenden aproximadamente el 30-40% de los NHL adultos (Harris, N. L. et al., Hematol. J., 1:53-66 (2001)) e incluye el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de células T periféricas, y linfoma anaplásico de células grandes. La quimioterapia de combinación de primera línea cura menos de la mitad de los pacientes con NHL agresivos y la mayoría de los pacientes finalmente sucumben a su enfermedad (Fischer, R.I., Semin. Oncol., 27 (suplemento 12): 2-8 (2000)).

[0006] Las células T maduran en el timo que proporciona un ambiente para la proliferación y diferenciación de células T inmaduras. Durante la maduración de células T, las células T realizan el reajuste de genes que producen el receptor de células T y la selección positiva y negativa que ayuda a determinar el fenotipo de la superficie celular de la célula T madura. Los marcadores característicos de la superficie celular de células T maduras son el complejo CD3:receptor de célula T y uno de sus correceptores, CD4 o CD8.

[0007] En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a membranas que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a membrana se expresan de manera más abundante en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha proporcionado la capacidad de reconocer específicamente células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos. En este aspecto, cabe indicar que la terapia basada en anticuerpos se ha demostrado muy eficaz en el tratamiento de ciertos tumores. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambas de Genentech Inc, South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado satisfactoriamente para tratar el cáncer de mama y el linfoma de no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se observa la sobreexpresión de la proteína HER2 en el 25-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo

monoclonal murino/humano quimérico modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales u malignos. Estos anticuerpos se producen recombinantemente en células CHO.

[0008] En otros intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar (1) polipéptidos no asociados a membrana que son producidos específicamente por uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación a por uno o más tipos particulares de células normales no cancerosas, (2) polipéptidos que son producidos por células cancerosas en un nivel de expresión que es significativamente más elevado que el de una o más células normales no cancerosas, o (3) polipéptidos cuya expresión está limitada específicamente a sólo un tipo de tejido (o a un número muy limitado de diferentes tejidos) tanto en estado canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y de tumor de próstata). Dichos polipéptidos pueden permanecer localizadas intracelularmente o se puede secretar por la célula cancerosa. Además, dichos polipéptidos pueden expresarse no por la propia célula cancerosa, sino por células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o un efecto de aumento del crecimiento en células cancerosas. Dichos polipéptidos secretados son a menudo proteínas que proporcionan células cancerosas con una ventaja de crecimiento sobre las células normales e incluyen cosas, tales como factores angiogénicos, factores de adhesión celular, factores de crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de antagonistas de dichos polipéptidos no asociados a membrana sirviera como agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de dichos cánceres. Además, la identificación del patrón de expresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

[0009] A pesar de los avances identificados anteriormente en la terapia contra el cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de agentes terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de tumores en un mamífero y para inhibir de manera eficaz el crecimiento de células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, un objetivo de la presente solicitud es identificar polipéptidos, polipéptidos asociados a membrana, secretados o intracelulares, cuya expresión está limitada específicamente a un único tipo de tejido (o un número muy limitado de diferentes tipos de tejido), tejidos hematopoyéticos, tanto en estado canceroso o no canceroso, y utilizar estos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y/o la detección de cáncer hematopoyético en mamíferos.

[0010] CD79 es el componente de señalización del receptor de células B que consisten en un heterodímero covalente que contiene CD79a (Ig α , mb-1) y CD79b (Ig β , B29). CD79a y CD79b contienen cada uno un dominio de inmunoglobulina (Ig) extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular, un dominio de motivo de activación de base tirosina de inmunoreceptor (ITAM). CD79 se expresa en células B y en células de linfoma no de Hodgkin (NHS) (Cabezudo et al., *Hoematologica*, 84:413-418 (1999); D'Arena et al., *Am. J. Hematol.*, 64: 275-281 (2000); Olejniczak et al., *Immunol. Invest.*, 35: 93-114 (2006)). CD79a y CD79b y slg son todos necesarios para la expresión en la superficie del CD79 (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270-7)). La expresión promedio en superficie de CD79b en NHLs es similar a la de las células B normales, pero con un mayor intervalo (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270-7 (2001)).

[0011] Dada la expresión de CD79b, es beneficioso producir anticuerpos terapéuticos para el antígeno de CD79b que crean una antigenicidad mínima o nula cuando se administran a pacientes, especialmente para un tratamiento crónico. La presente invención satisface esta y otras necesidades. La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que superan las limitaciones de las composiciones terapéuticas actuales y ofrece ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Los anticuerpos anti-CD79b se describen en WO 01/71005; Polson et al (2007), *Blood* 110(2). PP 616-623; y Okazaki et al (1993), *Blood* 81(1). PP 84-94.

[0012] La utilización de conjugados anticuerpo-fármaco (ADCC), es decir inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos que eliminan o inhiben células tumorales en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9); 1137-1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; US 4975278) permite la administración dirigida del grupo farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad a células normales, así como las células tumorales a eliminar (Baldwin et al (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers de Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al (ed.s), pág. 475-506). Los esfuerzos por mejorar el índice terapéutico, es decir la máxima eficacia y la mínima toxicidad de ADC se han centrado en la selectividad de anticuerpos policlonales (Rowland et al (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87) y monoclonales (mAbs), así como propiedades de unión a fármacos y de liberación de fármacos (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549). Los grupos farmacológicos utilizados en conjugados de anticuerpo y fármaco incluyen toxinas proteicas bacterianas, tales como la toxina de la difteria, toxinas proteicas de plantas, tales como ricina, moléculas pequeñas, tales como auristatinas, geldanamicina (Mandler et al (2000) *J. de the Nat. Cancer Inst.* 92(19); 1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), caliqueamicina (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342), daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al (1986) supra). Los grupos farmacológicos

pueden afectar a los mecanismos citotóxicos y citostáticos incluyendo la unión a tubulina, la unión a ADN, o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos receptores de proteína.

5 **[0013]** Los péptidos de auritatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de
 dolastatina (WO 02/088172), se han conjugado como grupos farmacológicos a: (i) anticuerpos monoclonales
 quiméricos cBR96 (específicos a Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico a CD30 en tumores malignos
 10 hematológicos (Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina et al (2003) *Nature*
Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) anticuerpos
 anti-CD20, tales como rituxan (WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos
 inmunes; (iv) anticuerpo anti-EphB2R 2H9 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao et al (2004) *Cancer*
 15 *Research* 64(3):781 - 788); (v) E-selectin antibody (Bhaskar et al (2003) *Cancer Res.* 63: 6387-6394); (vi)
 trastuzumab (HERCEPTIN®, US 2005/0238649), y (vi) anticuerpos anti-CD30 (WO 03/043583). Las variantes de
 auristatina E se describen en US 5767237 y US 6124431. La monometilauristatina E conjugada a anticuerpos
 monoclonales se describen en Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume
 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han
 conjugado a varios anticuerpos (US 2005/0238649).

20 **[0014]** Los medios de unión convencionales, es decir la unión a través de enlaces covalentes, un grupo
 farmacológico a un anticuerpo conduce en general a una mezcla heterogénea de moléculas en la que los grupos
 farmacológicos se unen a un conjunto de sitios en el anticuerpo. Por ejemplo, los grupos farmacológicos se han
 conjugado habitualmente a anticuerpos a través de frecuentes y numerosos residuos de lisina de un anticuerpo,
 generando una mezcla heterogénea de conjugado anticuerpo-fármaco. Dependiendo de las condiciones de
 25 reacción, la mezcla heterogénea contiene habitualmente una distribución de anticuerpos con desde 0 a
 aproximadamente 8 o más de grupos farmacológicos unidos. Además, en cada subgrupo de conjugados con un
 intervalo de números enteros particulares de grupos farmacológicos con respecto a anticuerpos, es una mezcla
 potencialmente heterogénea donde el grupo farmacológico está unido a varios sitios en el anticuerpo. Los métodos
 analíticos y preparativos pueden ser inadecuados para separar y caracterizar las moléculas de especies conjugadas
 anticuerpo-fármaco en la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son
 30 biomoléculas grandes, complejas y estructuralmente diversas, a menudo con muchos grupos funcionales reactivos.
 Sus reactividades con reactivos enlazadores e intermedios fármaco-enlazador dependen de factores, tales como el
 pH, concentración, concentración de sales y codisolventes. Además, el proceso multietapas de conjugación puede
 ser no reproducible debido a las dificultades en el control de las condiciones de reacción y los reactivos e
 intermedios caracterizantes.

35 **[0015]** Los tioles de cisteína son reactivos a pH neutro, a diferencia de la mayoría de aminas que están protonadas y
 son menos nucleofílicas próximas a pH 7. Dado que los grupos tiol libre (RSH, sulfhidrilo) son relativamente
 reactivos, las proteínas con residuos de cisteína a menudo existen en su forma oxidada como oligómeros unidos a
 disulfuro o tienen grupos disulfuro con puentes internos. Las proteínas extracelulares no tienen en general tioles
 40 libres (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, en la página 55).
 Los grupos tiol de cisteínas de anticuerpos son generalmente más reactivos, es decir, más nucleofílicos, hacia los
 reactivos de conjugación electrofílica que los grupos amina o hidroxilo de anticuerpo. Los residuos de cisteína se
 han introducido en las proteínas mediante técnicas de ingeniería genética para formar uniones covalentes a ligandos
 o para formar nuevos enlaces disulfuro intramoleculares (Better et al (1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650; Bernhard
 45 et al (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood et al (1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255; Tu et al
 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:4862-4867; Kanno et al (2000) *J. de Biotechnology*, 76:207-214; Chmura et al
 (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(15):8480-8484; US 6248564). Sin embargo, la modificación en los grupos tiol
 de cisteína mediante la mutación de varios residuos de aminoácidos de una proteína en aminoácidos de cisteína es
 potencialmente problemática, en particular en el caso de residuos no emparejados (Cys libre) o aquellos que son
 50 relativamente accesibles para la reacción u oxidación. En soluciones concentradas de la proteína, ya sea en el
 periplasma de *E. coli*, los sobrenadantes de cultivo, o proteína purificada parcial o completamente, los residuos de
 Cys no emparejados en la superficie de la proteína se pueden emparejar y oxidar para formar disulfuros
 intermoleculares y, por tanto, dímeros o multímeros de proteínas. La formación de dímeros de disulfuro hace que la
 nueva Cys sea no reactiva para la conjugación a un fármaco, ligando u otro marcador. Además, si la proteína forma
 55 de manera oxidativa un enlace disulfuro intramolecular entre la Cys recién formada y el residuo de Cys existente,
 ambos grupos tiol de Cys no están disponibles para la participación del sitio activo e interacciones. Además, la
 proteína se puede volver inactiva o no específica, mediante el error en el plegamiento o la pérdida de la estructura
 terciaria (Zhang et al (2002) *Anal. Biochem.* 311:1-9).

60 **[0016]** Los anticuerpos diseñados con cisteína se han diseñado como fragmentos de anticuerpos FAB (tioFab) y
 expresado como anticuerpos monoclonales IgG (tioMab) de longitud completa (Junutula, J.R. et al. (2008) *J Immunol*
Methods 332:41-52; US 2007/0092940). Los anticuerpos tioFab y tioMab se han conjugado a través de los
 enlazadores en los tioles de cisteína nuevas introducidas con reactivos enlazadores reactivos en tiol y reactivos
 65 enlazadores de fármacos para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco (Tio ADC).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0017] La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b o fragmentos funcionales de los mismos, y su método de utilización en el tratamiento de tumores hematopoyéticos.

5 **[0018]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior y posteriormente, tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, incluyendo
10 fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diabodies, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido CD79b a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar
15 opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un maitansinoide, un derivado de dolostatina o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para los fines de detección, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar de forma detectable, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0019] Opcionalmente, la invención proporciona un anticuerpo anti-Cd79b humanizado en el que la afinidad monovalente (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento Fab a CD79b) o afinidad en su forma bivalente del anticuerpo a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento de IgG a CD79b) es sustancialmente la misma que, inferior que, o superior que, la afinidad monovalente o afinidad en su forma bivalente, respectivamente, de un anticuerpo murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab o como un fragmento IgG a CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab o como un fragmento IgG a CD79b) que comprende, consiste o consiste esencialmente en una
20 secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada tal como se representa en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14).

[0020] En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 2,0 nM.
30

[0021] En la presente invención, se proporciona un anticuerpo que se une a CD79b, en el que el anticuerpo comprende las siguientes secuencias HVR:
35 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A16, en la que A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 23)
(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 24)
(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es FQGTHFPFT (SEQ ID NO: 25)
(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 31)
(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 32)
y
40 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F6 es ARNLYL (SEQ ID NO: 33).

[0022] De este modo, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 31-33).
45

[0023] La presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 23-25).

[0024] En una realización, la presente invención incluye un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 16. En otra realización, la presente invención incluye un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.
50

[0025] En una realización, la presente invención incluye un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres y una secuencia seleccionada de las SEQ ID NOS: 91-122. El anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas se puede unir a un polipéptido CD79b. El anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas se puede preparar mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína.
55

[0026] También se describe en este documento un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres, en el que el anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas se une a un polipéptido CD79b y se prepara mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína, en el que el anticuerpo parental comprende por lo menos una secuencia de HVR seleccionada entre:
60 (a) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, en la que A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 59);
65 (b) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 60);
(c) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es WQGTHFPYT (SEQ ID NO: 61) O

FQGTHFPFT (SEQ ID NO: 79);

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 62);

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 63)
y

5 (f) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F10 es ARNLYL (SEQ ID NO: 64)

10 **[0027]** El anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido CD79b a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tales como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina o maitansinoide. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o proliferación de o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar de forma detectable, unirse a un soporte sólido, o similares.

20 **[0028]** En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo CD79b (que, tal como se define aquí, incluye la longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la presente invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo.

25 **[0029]** En un aspecto, la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención o un conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 **[0030]** En el presente documento se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, en el que la composición comprende uno o más anticuerpos CD79b de la presente invención; y

[0031] un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos CD79b de la presente invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón.

35 **[0032]** En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo CD79b de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular.

40 **[0033]** También se describe el uso de un artículo de fabricación de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular; y

[0034] uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular.

45 **[0035]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro de inhibición del crecimiento de una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la presente invención, provocando así la inhibición del crecimiento de dicha célula. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

50 **[0036]** En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la invención para utilizar en un método de tratamiento de un mamífero que comprende inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD79b, en el que dicha célula es una célula tumoral.

55 **[0037]** En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la invención para utilizar en un método de tratamiento terapéutico de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando así de manera eficaz a dicho mamífero. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

60 **[0038]** En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la invención para utilizar en un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con la expresión incrementada de CD79b, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando o previniendo así de manera eficaz dicho trastorno proliferativo celular. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un

agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0039] En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es por lo menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0040] En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para utilizar en un método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es por lo menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando así de manera eficaz dicho tumor. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0041] En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para utilizar en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente la formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado descrito aquí, un diluyente, portador o excipiente aceptable.

[0042] En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro de inhibición de la proliferación de células B que comprende exponer una célula a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a CD79b.

[0043] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de determinación de la presencia de CD79b en una muestra sospechosa de contener CD79b, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo de la presente invención, y determinar la unión de dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra, en el que la unión de dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

[0044] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno proliferativo celular asociado con un incremento en células, tales como células B, que expresan CD79b, comprendiendo el método poner en contacto células de análisis en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a células de análisis en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD79b; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra de control, en el que el nivel de anticuerpo unido está normalizado al número de células que expresan CD79b en las muestras de análisis y control y, en el que un nivel más elevado de anticuerpo unido en la muestra de análisis en comparación con la muestra de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan CD79b.

[0045] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de CD79b soluble en sangre o suero, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de análisis de sangre o suero de un mamífero sospechoso de experimentar un trastorno proliferativo de células B con un anticuerpo anti-CD79b de la presente invención y detectar un incremento en CD79b soluble en la muestra de análisis en relación con una muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal

[0046] También se describe un método de unión de un anticuerpo de la presente invención a una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la presente invención. En una realización el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0047] La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un ADNc de PRO36249, en el que la SEQ ID NO: 1 es un clon designado aquí como "DNA225786" (también referido aquí como "CD79b"). La secuencia de nucleótidos codifica CD79b con los codones de inicio y parada en negrita y subrayados.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1 mostrada en la figura 1.

La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de la cadena ligera de IgG1 quimérico 2F2 (ch2F2) (2F2 es un anticuerpo monoclonal anti-CD79b murino). La secuencia de nucleótidos codifica la cadena ligera de ch2F2 mostrada en la figura 4 con el primer codón (que codifica el primer aminoácido de la SEQ ID NO: 4) mostrado en negrita y subrayado.

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 3 mostrada en la figura 3. Las regiones variables son regiones no subrayadas.

La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de la cadena pesada de anticuerpo IgG1 quimérico murino (ch2F2) (2F2 es un anticuerpo monoclonal anti-CD79b murino). La secuencia de nucleótidos codifica la cadena pesada de ch2F2 mostrada en la figura 6 con el primer codón (que codifica el primer aminoácido de la SEQ

ID NO: 6) mostrado en negrita y subrayado.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 5 mostrada en la figura 5. Las regiones variables son regiones no subrayadas.

La figura 7 muestra la alineación de las secuencias de las cadenas ligeras variables para los siguientes: secuencia consenso kappa I humana de cadena ligera (marcada como "huKI"; SEQ ID NO: 9) con VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (SEQ ID NOs: 65-68, respectivamente), anticuerpo anti-CD79b 2F2 murino (marcado como "mu2F2" y también referido aquí como "2F2"; SEQ ID NO: 10), anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (marcado como "injerto hu2F2"; SEQ ID NO: 11) y variante 7 de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (marcado como "hu2F2.D7"; SEQ ID NO: 12) (que contiene 71A, 73T y 78A). Las posiciones se enumeran según Kabat y las regiones hipervariables (HVR) injertadas de 2F2 murino al armazón consenso kappa I de cadena ligera variable están encuadradas.

Las figuras 8A-B muestran la alineación de secuencias de las cadenas pesadas variables para los siguientes: secuencia consenso del subgrupo III humana de cadena pesada (marcado como "humIII"; SEQ ID NO: 13) con VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3, y VH-FR4 (SEQ ID NOs: 69-72, respectivamente), anticuerpo anti-CD79b 2F2 murino (marcado como "mu2F2" y también referido aquí como "2F2"; SEQ ID NO: 14), anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (marcado como "injerto hu2F2"; SEQ ID NO: 15) (que contiene 71A, 73T y 78A) y variante 7 de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (marcado como "hu2F2.D7"; SEQ ID NO: 16) (que contiene 71A, 73T y 78A). Las posiciones se enumeran según Kabat y las regiones hipervariables (HVR) injertadas de 2F2 murino al armazón consenso de subgrupo II de cadena pesada variable están encuadradas.

La figura 9 muestra la secuencia de HVR de una variante de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 seleccionado (SEQ ID NO: 18), en la que la variante tiene múltiples cambios de aminoácidos en una única HVR del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (parte de HVR-L3 (SEQ ID NO: 61) mostrada en la figura 9 como SEQ ID NO: 17). Las secuencias de las cadenas ligera variable y pesada variable fuera de los cambios de aminoácidos mostrados eran idénticas al injerto 2F2 y no se muestran. No se observaron cambios en HVR-L1 (SEQ ID NO: 59), HVR-L2 (SEQ ID NO: 60), HVR-H1 (SEQ ID NO: 62); HVR-H2 (SEQ ID NO: 63) o HVR-H3 (SEQ ID NO: 64) del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2.

La figura 10 muestra un análisis Biacore de anticuerpos anti-CD79b seleccionados, incluyendo anticuerpo ch2F2 murino (marcado como "ch2F2"), anticuerpos "humanizados" injertados con 2F2 (marcado como "injerto de hu2F2" y también referidos aquí como "injerto de 2F2"), y la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) (89F, 96F; SEQ ID NO: 18) para los antígenos designados, incluyendo el dominio extracelular de CD79b humano (huCD79b_{ccd}), el dominio extracelular de CD79b humano fusionado a Fc (huCD79b_{ccd}-Fc) y un péptido de 16 aminoácidos que contiene el epítipo para 2F2 (péptido de 16 unidades; SEQ ID NO: 78; epítipo en los aminoácidos 1-11 de la SEQ ID NO: 78). La unión no detectada se designa en la figura como "NB".

Las figuras 13A-B (armazones consenso de la cadena pesada variable (VH)) y la Figura 12 (armazones consenso de la cadena ligera variable (VL)) representan secuencias de armazón consenso humano aceptoras de ejemplo para utilizar en la realización de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes: (Figuras 11A-B) armazón consenso del subgrupo I de VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 36), armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 37-39), armazón consenso del subgrupo II de VH humana menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 40), armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 41-43), armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 44), armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 45-47), armazón aceptor de VH humano menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 48), armazón aceptor de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 49-50), armazón aceptor 2 de VH humano menos CDR de Kabat (SEQ ID NO: 51) y armazón aceptor 2 de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 52-54) y (Figura 12) armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano (SEQ ID NO: 55), armazón consenso del subgrupo II kappa de VL humano (SEQ ID NO: 56), armazón consenso del subgrupo III kappa humano (SEQ ID NO: 57) y armazón consenso del subgrupo IV kappa humano (SEQ ID NO: 58).

Las figuras 13A (cadena ligera) y 13B (cadena pesada) muestran secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de la presente invención (2F2.D7). Las figuras 13A (cadena ligera) y 13B (cadena pesada) muestran secuencias de aminoácidos del armazón (FR), región hipervariable (HVR), primer dominio constante (CL o CH1) y región Fc (Fc) de una realización de un anticuerpo de la presente invención (hu2F2.D7) (SEQ ID NOs: 19-26 (Figura 13A) y SEQ ID NOs: 27-35 (Figura 13B)). Se muestran las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variable y constante) de las cadenas ligera y pesada de 2F2.D7 (SEQ ID NO: 89 (Figura 13A) y 90 (Figura 13B), respectivamente, con los dominios constantes subrayados. Se muestran secuencias de aminoácidos de los dominios variables (SEQ ID NO: 12 (Figura 13A para cadena ligera) y SEQ ID NO: 16 (Figura 13B para cadena pesada)).

La figura 14 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de humano (SEQ ID NO: 2), mono cynomolgus (cyno) (SEQ ID NO: 7) y ratón (SEQ ID NO: 8). CD79b de humano y cyno tienen un 85% de identidad de aminoácidos. Se indican la secuencia señal, péptido de prueba (el epítipo de 11 aminoácidos para el anticuerpo 2F2 descrito en el ejemplo 1; los aminoácidos 1-11 (ARSEDYRNPCK) de SEQ ID NO: 78), dominio transmembrana (TM) y dominio de motivo de activación de base tirosina de inmunoreceptor (ITAM). La región encuadrada es la región de CD79b que está ausente en la variante de empalme de CD79b (descrita en el ejemplo 1).

La figura 15 muestra representaciones de conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas (ADC) donde un grupo farmacológico está unido a un grupo cisteína modificado en: la cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC); y la región Fc (Fc-ADC).

La figura 16 muestra las etapas de: (i) reducir los aductos de disulfuro de cisteína y los disulfuros intercadenas e

intracadenas en un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas (TioMab) con agente reductor TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidar para volver a formar enlaces disulfuro intercadenas e intracadenas con dhAA (ácido deshidroascórbico); y (iii) conjugar el anticuerpo reoxidado con un intermedio enlazador a fármaco para formar un conjugado de fármaco y anti-CD79b con cisteína (ADC).

5 La figura 17 muestra (A) la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 86) y (B) la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 85) del anticuerpo humanizado anti-CD79b modificado con cisteínas (tio-hu2F2.D7-HC-A118C), en que una alanina en la posición EU 118 (posición secuencial de alanina 118; posición Kabat 114) de la cadena pesada se modificó a una cisteína. Se puede unir un grupo farmacológico al grupo cisteína modificado en la cadena pesada. En cada figura, el aminoácido alterado se muestra en texto en negrita con doble subrayado. El subrayado simple indica regiones constantes. Las regiones variables son regiones no subrayadas. La región Fc está marcada en cursiva. "Tio" se refiere a anticuerpo modificado con cisteína, mientras que "hu" se refiere un anticuerpo humanizado.

10 La figura 18 muestra (A) la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 88) y (B) la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 87) del anticuerpo humanizado anti-CD79b modificado con cisteínas (tio-hu2F2.D7-LC-V205C), en que una valina en la posición Kabat 205 (posición secuencial valina 210) de la cadena ligera se modificó a cisteína. El aminoácido D en la posición EU 6 (sombreado en la figura) de la cadena pesada puede ser alternativamente E. Se puede unir un grupo farmacológico al grupo cisteína modificado en la cadena pesada. En cada figura, el aminoácido alterado se muestra en texto en negrita con doble subrayado. El subrayado simple indica regiones constantes. Las regiones variables son regiones no subrayadas. La región Fc está marcada en cursiva. "Tio" se refiere a un anticuerpo modificado con cisteínas.

20 La figura 19 es un gráfico de inhibición de crecimiento de un tumor in vivo en un modelo de xenoinjerto de BJAB con luciferasa que muestra que la administración de anticuerpos anti-CD79b (a) ch2F2-SMCC-DM1, carga de fármaco de aproximadamente 3 (tabla 7) y (b) hu2D2.D7-SMCC-DM1, carga de fármaco de aproximadamente 2,3 (tabla 7), a ratones SCID que tienen tumores de células B humanas, inhibió significativamente el crecimiento tumoral. Los controles incluían HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SM-CC-DM1). "hu" se refiere a un anticuerpo humanizado y "ch" se refiere a un anticuerpo quimérico.

25 La figura 20A es un gráfico de inhibición de crecimiento de un tumor in vivo en un modelo xenoinjerto Granta-519 (Linfoma de Células de Manto Humano) que muestra que la administración de anticuerpo anti-CD79b, hu2F2.D7-SMCC-DM1, carga de fármaco de aproximadamente 2,8 (tabla 8) a ratones SCID que tienen tumores de células B humanas, inhibió significativamente el crecimiento tumoral. Los controles incluían HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). La figura 20B es una representación del porcentaje de cambio de peso en los ratones del estudio de xenoinjerto Granta-519 (Figura 20A y Tabla 8) que muestra que no hubo un cambio significativo en el peso durante los primeros 7 días del estudio. "hu" se refiere a un anticuerpo humanizado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

35 **[0048]** La presente invención proporciona y/o la solicitud describe métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar composiciones útiles para el tratamiento de tumores hematopoyéticos en mamíferos y métodos de utilización de estas composiciones de materia para el mismo,.

40 **[0049]** Los detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación se proporciona en la presente.

I. Técnicas generales

45 **[0050]** La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que se encuentra en el sector. Dichas técnicas se explican en detalle en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

II. Definiciones

55 **[0051]** Para los objetivos de interpretar esta memoria, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y al revés. En el caso de cualquiera de las definiciones entre en conflicto con cualquier documento incorporado aquí por referencia, prevalecerá la definición establecida a continuación.

60 **[0052]** Un "marcador de la superficie de células B" o "antígeno de la superficie de células B" en la presente invención es un antígeno expresado en la superficie de una célula B que se puede reconocer con un antagonista que se une al mismo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos para un antígeno de la superficie de células B o una forma soluble de un antígeno de la superficie de células B capaces de antagonizar la unión de un ligando al antígeno de células B natural. Ejemplos de marcadores de la superficie de células B incluyen los marcadores de la superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para las descripciones,

véase The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Otros marcadores de la superficie de células B incluyen RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLYS, BtIG, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA I, FcRH6, BCMA, y 239287. El marcador de la superficie de células B de particular interés se expresa preferencialmente en células B en comparación con otros tejidos que no son células B de un mamífero y se puede expresar en células B precursoras y células B maduras.

[0053] El término "CD79b", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier CD79b nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos, mono cynomolgus (cyno)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. CD79b humano también se refiere aquí como "PRO36249" (SEQ ID NO: 2) y es codificado por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) también referido aquí como "DNA225786". El término "CD79b" comprende CD79b no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de CD79b que resulta del procesamiento en la célula. El término también comprende variantes naturales de CD79b, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos CD79b descritos aquí se pueden aislar de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. Un "polipéptido CD79b de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma de secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido CD79b derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos CD79b de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido CD79b de secuencia nativa" comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido CD79b específica (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En ciertas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos CD79b de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras acompañantes. Los codones de inicio y parada (si se indican) se muestran en negrita y subrayado en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como "N" en las figuras acompañantes son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, aunque se muestra que los polipéptidos CD79b descritos en las figuras acompañantes empiezan con residuos de metionina designados aquí como la posición I de aminoácido en las figuras, es imaginable y posible que otros residuos de metionina localizados hacia arriba o abajo desde la posición 1 de aminoácido en las figuras se puedan utilizar como residuo de aminoácido de partida para los polipéptidos CD79b.

[0054] El término "2F2" se utiliza en el presente documento para referirse a anticuerpo monoclonal anti-CD79b murino (también referido aquí como "mu2F2" o "2F2 murino") o anticuerpo quimérico (también referido aquí como "ch2F2").

[0055] "mu2F2" o "2F2 murino" se utilizan aquí para referirse específicamente a anticuerpo monoclonal anti-CD70b murino, en el que el anticuerpo murino comprende el dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 10 (figura 7) y el dominio variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 (figuras 8A-B). "mu2F" se pueden generar a partir de hibridomas depositados con la ATCC como PTA-7712 el 11 de julio del 2006.

[0056] "ch2F2" o "anticuerpo quimérico 2F2" se utiliza aquí para referirse específicamente al anticuerpo quimérico (tal como se describe previamente en la publicación de Estados Unidos No. US 2007207142 presentada el 3 de agosto de 2006), en el que el anticuerpo quimérico comprende la cadena ligera de SEQ ID NO: 4 (figura 4), en la que la cadena ligera comprende el dominio variable de SEQ ID NO: 10 (figura 7) y el dominio constante de cadena ligera de IgG1 humana. El anticuerpo quimérico comprende además la cadena pesada de SEQ ID NO: 6 (figura 6), en la que la cadena ligera comprende el dominio variable de SEQ ID NO: 14 (figuras 8A-B) y el dominio constante de cadena pesada de la IgG1 humana.

[0057] "injerto de 2F2" o "anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2" o "injerto hu2F2" se utiliza aquí para referirse específicamente al injerto generado mediante el injerto de las regiones hipervariables del anticuerpo 2F2 murino (mu2F2) en la secuencia consenso de kappa I de VL humana aceptora (huKI) y la secuencia consenso de VH del subgrupo III humana con R71A, N73T y L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992) (véase el ejemplo 1A y las figuras 7 (SEQ ID NO: 11) y 8 (SEQ ID NO: 15)).

[0058] Una "modificación" de residuo/posición de aminoácido, tal como se utiliza aquí, se refiere a un cambio de una secuencia primaria de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos inicial, donde el cambio resulta de una alteración en la secuencia que implica dichos residuos/posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo (o en dicha posición) por otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservativa o no conservativa), la inserción de uno o más aminoácidos (generalmente menos de 5 ó 3) adyacentes a dicho residuo/posición y la delección de dicho residuo/posición. Una "sustitución de aminoácido", o variación de la misma, se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (inicial) por un residuo de aminoácido diferente. En general y preferiblemente, la modificación da lugar a la alteración en por lo menos una actividad físicoquímica del polipéptido variante en comparación con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos inicial (o "tipo salvaje"). Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, la actividad físicoquímica que se altera puede ser la afinidad de unión, la capacidad de unión y/o el efecto de unión en una molécula diana.

[0059] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y específicamente cubre, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD79b individuales (incluyendo anticuerpos agonista, antagonista, neutralizantes, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), composiciones de anticuerpos anti-CD79b con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que muestren la actividad biológica deseada) formados a partir de por los menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos anti-CD79b de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpos anti-CD79b (véase a continuación), incluyendo fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diabodies, anticuerpos de dominio único (sdAbs), siempre que muestren la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con el anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0060] El término "anticuerpo anti-CD79b" o "un anticuerpo que se une a CD79b" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD79b con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de CD79b. Preferiblemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD79b a una proteína que no es CD79b no relacionada es inferior a aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a CD79b mediada, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a CD79b tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD79b se une a un epítipo de CD79b que se conserva entre los CD79b de diferentes especies.

[0061] Un "anticuerpo aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0062] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también está regularmente presenta puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0063] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0064] La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominio amino terminals de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede referir como "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

[0065] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un

anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón ("framework") (FRs) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0066] Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0067] Un "anticuerpo desnudo" para los objetivos de la presente invención es un anticuerpo que no está conjugado a un grupo citotóxico o marcador radioactivo.

[0068] " Los "fragmentos de anticuerpos" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y de este modo retiene la capacidad de unión a antígeno.

[0069] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ grande único que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0070] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0071] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un péptido enlazador de manera que el las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0072] "Fv de cadena única", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0073] El término "diabodies" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Los fragmentos de anticuerpo pequeños se preparan mediante la construcción de fragmentos sFv (ver párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL, de manera que se consigue el emparejamiento intercadenas, pero no intracadenas de los dominios V, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los "diabodies" pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los "diabodies" biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "entrecruzados" en que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los "diabodies" se describen con más detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993). También se describen "triabodies" y "tetrabodies" en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0074] El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0075] Entre los anticuerpos monoclonales incluyen aquí anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

[0076] " Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

[0077] "Tio", cuando se utiliza aquí para referirse a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo modificado en cisteína, mientras que "hu", cuando se utiliza aquí para referirse a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo humanizado.

[0078] Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido producido utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se describen aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuo de unión a antígeno no humano. Los anticuerpos humanos se

pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo biblioteca de expresión de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales métodos descritos en Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase, también, van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la estimulación antigénica, pero cuyos locus endógenos han sido desactivados, por ejemplo, xenoratón inmunizado (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6,075,181 y 6,150,584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

[0079] El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se utiliza aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Se utiliza un conjunto de delineaciones de la región hipervariable y se comprenden en la presente invención. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences de Proteins de Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El extremo del bucle CDRH1 de Chothia cuando se enumera utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto es debido a que el esquema de numeración de Kabat coloca inserciones en H35A y H35B; si ni 35 ni 35B están presentes, el bucle acaba en 32; si únicamente 35A está presente, el bucle acaba en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle acaba en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelaje del anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables “de contacto” se basan en el análisis de estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H351B (numeración Kabat)	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
H1	H31-H35 (numeración Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0080] Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” tal como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35B (H1), 50-65, 47-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se enumeran según Kabat et al., supra para cada una de estas definiciones.

[0081] Residuos de “armazón” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se define aquí.

[0082] El término “residuo de dominio variable que se enumera como en Kabat” o “posición de aminoácido que se enumera como en Kabat”, y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences de Proteins de Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondiente a un recorte o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat “estándar”.

[0083] El sistema de numeración Kabat se utiliza en general cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences de Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, Md. (1991)). El “sistema de numeración EU” o “índice EU” se utiliza en general cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat et al., supra).

El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuo del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique aquí lo contrario, las referencias a los números de residuo en el dominio variable de anticuerpos significa la numeración de residuo por el sistema de numeración Kabat. A menos que se indique aquí lo contrario, las referencias a los números de residuo en el dominio constante de anticuerpos significa la numeración del residuo mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la publicación WO2006 073941, Figuras para la numeración EU).

[0084] Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de CEDR que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad por mezcla de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o armazón se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0085] Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0086] Un "anticuerpo agonista", tal como se utiliza aquí, es un anticuerpo que mimetiza por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0087] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0088] "Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de la pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad de puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general a antígenos lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que anticuerpos de afinidad elevada se unen en general a antígenos más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos de medición de la afinidad de unión y cualquiera se puede utilizar para los objetivos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

[0089] "O mejor" cuando se utiliza aquí para referirse a la afinidad de unión se refiere a una unión más fuerte entre una molécula y su compañero de unión. "O mejor" cuando se utiliza aquí se refiere a una unión más fuerte, representada por un valor Kd numérico más pequeño. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una afinidad de unión de "0,6 nM o mejor", la afinidad del anticuerpo por el antígeno es inferior a 0,6 nM, es decir, 0,59 nM, 0,58 nM, 0,57 nM etc. o cualquier valor inferior a 0,6 nM.

[0090] En una realización, "Kd" o "el valor Kd" según la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con una versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (125 I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren toda la noche con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de ^{125}I -antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el

equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 μl / pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que produce menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, K_d o el valor de K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

[0091] Una "velocidad on" o "velocidad de asociación o " k_{on} " según la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) tal como se ha descrito anteriormente.

[0092] La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo/la misma", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significancia biológica y/o estadística escasa o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente inferior a aproximadamente el 50%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 40%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 30%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 20%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 10% en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

[0093] La frase "sustancialmente reducido/a" o "sustancialmente diferente", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística en el contexto de la característica biológica medida mediante dichos valores (por ejemplo, valores de K_d , respuesta HAMA). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente superior a aproximadamente un 10%, preferiblemente superior a aproximadamente un 20%, preferiblemente superior a aproximadamente un 30%, preferiblemente superior a aproximadamente un 40%, preferiblemente superior a aproximadamente un 50% en función del valor del anticuerpo de referencia/comparación.

[0094] Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido.

[0095] Un "armazón humano aceptor" para los objetivos de la presente invención es un armazón (framework) que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón VL o VH derivado de un armazón de inmunoglobulina humana, o de un armazón de consenso humano. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o armazón de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. Cuando los cambios preexistentes de aminoácidos están presentes, preferiblemente no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos cambios preexistentes de aminoácidos están presentes. Cuando los cambios preexistentes de aminoácidos están presentes en una VH, preferiblemente estos cambios son sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el armazón humano aceptor de VL es idéntico en la secuencia con la secuencia del armazón de inmunoglobulina humana VL o una secuencia de armazón de consenso humana.

[0096] Un "armazón de consenso humano" es un armazón que representa el residuo de aminoácidos más habitual en una selección de secuencias armazón VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. En una realización, para la VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al. En una realización, para la VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al.

[0097] Un "armazón de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de la cadena pesada variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón de consenso del subgrupo II de VH comprende por lo menos una parte o toda de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 69)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 70)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 71)-H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 72).

[0098] Un "armazón de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa de la cadena ligera variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón de consenso del subgrupo I de VL comprende por lo menos una parte o toda de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 65)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 66)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 67)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 68).

[0099] Un "armazón humano no modificado" es un armazón humano que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el armazón humano aceptor, por ejemplo, que carece de la sustitución o sustituciones de aminoácidos humanos en no humanos en el armazón humano aceptor.

[0100] Una "región hipervariable alterada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que comprende una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, de una a aproximadamente 16) en la misma.

[0101] Una "región hipervariable no modificada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del que derivaba, es decir una que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en la misma.

[0102] Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, un polipéptido antígeno diana asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo es útil como agente terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresan el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a una proteína "no diana" será inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo a su proteína diana particular tal como se determina mediante un análisis mediante separador celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. El término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se pueden mostrar, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una Kd para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo polipéptido.

[0103] Un anticuerpo que "inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido CD79b" o un anticuerpo "inhibidor del crecimiento" es aquel que da lugar a una inhibición de crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido CD79b apropiado. El polipéptido CD79b puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-CD79b inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan CD79b en más de un 20%, preferiblemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 50% e incluso, más preferiblemente, en más de un 50%, (por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%), en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo a analizar. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o

aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como las descritas en la sección de Ejemplos Experimentales siguiente. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-CD79b a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción en el tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

[0104] Un anticuerpo que "induce apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente aquella que sobreexpresa un polipéptido CD79b. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula hematopoyética, tal como una célula B, una célula T, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, plaquetas o eritrocitos. Existen varios métodos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del "laddering" del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es aquel que da lugar de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a annexina en relación a célula no tratada en un ensayo de unión a annexina.

[0105] Un anticuerpo que "induce la muerte celular" es aquel que provoca que una célula viable se convierta no viable. La célula es aquella que expresa un polipéptido CD79b y es de un tipo de célula que expresa o sobreexpresa específicamente un polipéptido CD79b. La célula puede ser cancerosa o células normales del tipo de célula particular. El polipéptido CD79b puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B o célula T. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia de complemento y células efectoras inmunes para diferenciar la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo para la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de integridad de membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propicio (PI), azul de tripano (véase Moore et al. Cytotechnology 17:1-1 (1995)) o 7AAD se pueden evaluar en relación a células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular preferidos son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

[0106] Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

[0107] El término "región Fc" en este documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente se define por extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al carboxilo terminal de la misma. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo, o por la modificación recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpo sin K447 residuos eliminados, y poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0108] Una "región funcional Fc" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. "Funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión de C1q, CDC; unión a receptores Fc, ADCC; fagocitosis; regulación a la baja de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar mediante diversos análisis descritos, por ejemplo, en las definiciones de la presente invención.

[0109] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como

variantes naturales de las mismas.

[0110] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a por lo menos una modificación de aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante de la presente invención poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferible por lo menos aproximadamente un 90% de homología con la misma, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de homología con la misma.

[0111] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, eliminan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

[0112] Los términos "receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[0113] La unión a FcRn humano in vivo y la vida media en suero de polipéptidos de unión con afinidad elevada de FcRn humano se pueden analizar, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administra polipéptidos con una región Fc variante. WO 2000/42072 (Presta) describe variants de anticuerpos con una unión mejorada o disminuida a FcR. Véase también, por ejemplo, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

[0114] "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0115] "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). Las variants de polipéptido con las secuencias de aminoácidos de la región Fc alterada (polipéptidos con una región Fc variante) y una mayor o menor capacidad de unión a C1q se describen en por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,194,551 B1 y WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0116] El término "anticuerpo que comprende la región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante modificación recombinante del ácido nucleico que codifica

el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todas las K447 eliminadas o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

5 **[0117]** El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido CD79b se refiere a una forma del polipéptido CD79b que está libre esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, un ECD del polipéptido CD79b tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos CD79b de la presente invención se identifican siguiendo los criterios utilizados habitualmente en la técnica para la
10 identificación de ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como inicialmente se identificó aquí. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier extremo de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la memoria y dichos polipéptidos, con o
15 sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

[0118] La localización aproximada de los “péptidos señal” del polipéptido CD79b descrito aquí se puede mostrar en la presente memoria y/o las figuras acompañantes. Cabe indicar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los
20 extremos del límite C-terminal del péptido señal tal como se identificó inicialmente aquí, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y et al., Prot Eng, 10:1-6 (1997) y von Heinje y et al., Nucl Acids Res, 14:4683-4690 (1986)). Además, también se ha reconocido, que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, cuando el péptido señal se divide en no más de
25 aproximadamente 5 aminoácidos por cualquier extremo del límite C-terminal del péptido señal identificado aquí, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

[0119] “Variante de polipéptido CD79b” significa un polipéptido CD79b, preferiblemente un polipéptido CD79b activo, tal como se define aquí que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia con una secuencia de polipéptido CD79b de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido CD79b que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido CD79b de longitud completa tal como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido CD79b de longitud completa). Dichas variantes de polipéptido CD79b incluyen, por ejemplo, los polipéptidos CD79b en donde uno o más residuos de aminoácido se añaden, o eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido CD79b tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de un polipéptido CD79b de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido CD79b que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido CD79b de longitud completa tal como se describe aquí. Generalmente, las variantes de polipéptido de CD79b tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más.
40 Opcionalmente, los polipéptidos variantes de CD79b tendrán no más de una sustitución conservativa de aminoácido en comparación con la secuencia de polipéptido CD79b nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones conservativas de aminoácido en comparación con la secuencia de polipéptido CD79b nativa.
45
50

[0120] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de péptido o polipéptido, es decir las secuencias del polipéptido CD79b identificadas en la presente invención, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de péptido o polipéptido específico, es decir la secuencia del polipéptido CD79b, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2,
55
60
65

en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0121] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencia de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

[0122] El "polinucleótido variante de CD79b" o "secuencia de ácidos nucleicos variante de CD79b" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido CD79b, preferiblemente un polipéptido CD79b activo, tal y como se define aquí, y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido CD79b de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido CD79b de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido CD79b de longitud completa tal y como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido CD79b de longitud completa). Habitualmente, un polinucleótido variante de CD79b tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido CD79b de secuencia nativa y de longitud completa tal y como se describe aquí, una secuencia de polipéptido CD79b de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido señal, tal y como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido CD79b de longitud completa tal y como se describe aquí. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

[0123] Habitualmente, los polinucleótidos variantes de CD79b tienen por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,65,70,75,80, 85, 90, 95, 100,105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de esa longitud referenciada.

[0124] El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el CD79b identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD79b de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede

compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

5 **[0125]** En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

15 donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

20 **[0126]** En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de CD79b son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido CD79b y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado rugosas, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD79b de longitud completa tal como se describe aquí. Los polipéptidos variantes de CD79b pueden ser aquellos codificados por un polinucleótido variante de CD79b.

25 **[0127]** El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido CD79b se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD79b de longitud completa de la invención (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan). El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la parte del ADNc que codifica el polipéptido CD79b que se inserta en el vector depositado con la ATCC (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan (los codones de inicio y parada están en negrita y subrayados en las figuras)).

30 **[0128]** El término “aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos CD79b descritos aquí, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido CD79b no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

35 **[0129]** Un ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido CD79b u otro ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico específica que codifica un polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

40 **[0130]** El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

45 **[0131]** Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra

secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0132] La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rugosas, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0133] “Condiciones rugosas” o “condiciones de rigurosidad elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 min a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de rigurosidad elevada de 10 min que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0134] Las “condiciones moderadamente rugosas” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rugosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rugosas es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0135] El término “epítipo etiquetado”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido Cd79b o un anticuerpo anti-CD79b fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0136] “Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido CD79b que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido CD79b nativo o natural, donde la actividad “biológica” se refiere a una función (inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido CD79b nativo o natural que es diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido CD79b nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido CD79b nativo o natural.

[0137] El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo CD79b. De manera similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido CD79b nativo. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos CD79b nativos, péptidos, oligonucleótidos no codificante, moléculas orgánicas

pequeñas, etc., agonistas o antagonistas. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido CD79b pueden comprender poner en contacto un polipéptido CD79b con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido CD79b.

5 **[0138]** "Purificada" significa que una molécula está presente en una muestra en una concentración de por lo menos un 95% en peso, o por lo menos un 98% en peso de la muestra en que está contenida.

10 **[0139]** Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de por lo menos otra molécula de ácido nucleico con la que está asociada normalmente, por ejemplo, en su medio natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de la de su localización cromosómica natural.

15 **[0140]** El término "vector", tal como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular al que se pueden unir segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden unir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada habitualmente.

20 **[0141]** "Polinucleótido" o "ácido nucleico", se utilizan indistintamente aquí, para referirse a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis, tal como mediante la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caps", sustitución de uno o más nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen grupos colgando, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, se puede sustituir cualquier grupo hidroxilo presente normalmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de bloqueo orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosa o lixosa, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativa. Estos grupos de unión alternativa incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 ("formacetal"), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C.) que opcionalmente contienen una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, incluyendo ARN y ADN.

55 **[0142]** "Oligonucleótido," tal como se utiliza aquí, se refiere en general a polipéptidos cortos generalmente sintéticos y generalmente de una cadena que generalmente, pero no necesariamente, tienen una longitud inferior a aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

65

[0143] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la patología fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores linfoides, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos y también carcinoma, blastoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de cáncer incluyen cánceres asociados a células B, incluyendo, por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de células B, tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma de no de Hodgkin (NHL), linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de célula grande, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica (CLL), tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL) y mielodisplasia) y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o células T. También se incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y células “asesinas” naturales. También se incluyen trastornos proliferativos de células B cancerosas seleccionados entre los siguientes: linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL resistente, NHL indolente resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeña, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto. Los orígenes de los cánceres de células B incluyen los siguientes; orígenes de linfoma de células B de zona marginal en células B de memoria en zona marginal; el linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes se originan en centrocitos en la zona ligera de los centros germinales, la leucemia linfocítica cónica y leucemia linfocítica pequeña se origina en células B1 (CD5+), el linfoma de células del manto se origina en células B sin tratar en la zona del manto y el linfoma de Burkitt se origina en centroblastos en la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas se refieren aquí como “tejidos de células hematopoyéticas” incluyen timo y médula ósea y tejidos linfoides periféricos, tales como bazo, nódulos linfáticos, tejidos linfoides asociados con mucosa, tales como tejidos linfoides asociados a intestinos, amígdalas, parches de Peyer y tejidos de apéndice y linfoide asociados con otras mucosas, por ejemplo, recubrimientos bronquiales. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de rincón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0144] Un “tumor de células B” aquí incluye linfoma no de Hodgkin (NHL), incluyendo NHL folicular/de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL folicular/de grado intermedio, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado elevado, NHL linfoblástico de grado elevado, NHL de célula no separada pequeña de grado elevado, NHL de enfermedad mediastínica masiva, linfoma de célula de manto, linfoma relacionado con el SIDA, y Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no de Hodgkin (NHL), enfermedad de Hodgkin predominante de linfocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), NHL indolente, incluyendo NHL indolente recidivante y NHL indolente resistente a rituximab; leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfoblástica crónica (CLL), leucemia de célula pilosa, leucemia mieloblástica crónica; linfoma de célula de manto y otros tumores hematológicos. Dichos tumores se pueden tratar con anticuerpos dirigidos contra marcadores de la superficie de células B, tales como CD79b. Dichas enfermedades se contempla aquí que se pueden tratar mediante la administración de un anticuerpo dirigido contra u marcador de la superficie de célula B, tal como CD79b, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado (“desnudo”) o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico aquí descrito. Dichas enfermedades también se contempla aquí que se tratan mediante terapia de combinación que incluyen un anticuerpo anti-CD79b o un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco de la invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie. En el método de tratamiento de la presente invención, un anticuerpo anti-CD79b de la presente invención se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD20, inmunoglobulinas o fragmento de unión a CD20 del mismo, juntos o de forma secuencial. El anticuerpo anti-CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de anticuerpo y fármaco. En una realización de la terapia de combinación, el anticuerpo anti-CD79 es un anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti-CD20 es Rituxan® (rituximab).

[0145] El término “linfoma no de Hodgkin” o “NHL”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un cáncer del sistema linfático diferente de los linfoma de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin se pueden diferencia generalmente de los linfomas no de Hodgkin por la presencia de las células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y la ausencia de dichas células en los linfomas deno de Hodgkin. Ejemplos de linfomas de Hodgkin comprendidos por el término tal como se utiliza aquí incluyend cualquiera que sería identificado como tal por un experto en la materia (por ejemplo, un oncólogo o patólogo) según los esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tales como el esquema de Revised European-American Lymphoma (REAL) descrito en Color Atlas de Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Véase, en particular, las listas en las figuras 11.57, 11.58 y 11.59. Ejemplos más específicos incluyen, pero sin limitación, NHL recidivante o resistente, NHL de grado bajo de la línea frontal, NHL de Etapa III/IV, NHL resistente a quimioterapia, leucemias/o

linfoma linfoblástica de precursores de B, linfoma linfocítica pequeña, leucemia linfocítica y/o leucemia prolinfocítica crónica de células B y/o linfoma linfocítica pequeña, linfoma prolinfocítica de células B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de zona marginal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma MALT de la zona marginal extranodal, linfoma de la zona marginal nodal, leucemia de célula pilosa, plasmacitoma y/o mieloma de célula de plasma, linfoma folicular/de grado bajo, NHL folicular/ de grado intermedio, linfoma de célula de manto, linfoma (folicular) de centro folicular, NHL difuso de grado intermedio, linfoma difuso de célula B, NHL agresivo (incluyendo NHL agresivo de la línea frontal y NHL agresivo recidivante), NHL recidivante después o resistente al trasplante de células madre autólogas, linfoma de células B amplias mediastinales primarias, linfoma de efusión primaria, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de célula no separada pequeña de grado alto, NHL de enfermedad mediastínica masiva, , linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular grande de precursor (periférica), micosis fungoides y/o síndrome de Sezary, linfomas de la piel (cutáneos), linfoma anaplásico de de célula grande, linfoma angiocéntrico.

[0146] Un "trastorno" es cualquier patología que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas qe incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar aquí incluyen patologías cancerosas, tales como tumores malignos y benignos; tumores que no son leucemias y linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros trastornos relacionados con la angiogénesis. Los trastornos incluyen además patologías cancerosas, tales como trastornos proliferativos de células B y/o tumores de células B, por ejemplo, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL resistente, NHL indolente resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

[0147] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

[0148] "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

[0149] Una "enfermedad autoinmune" en este documento es una enfermedad o un trastorno derivado de y dirigida contra los tejidos u órganos del propio individuo o un cosegregado o manifestación de los mismos o patología resultante del mismo. En muchos de estos trastornos autoinmunes e inflamatorios, pueden existir un conjunto de marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, pero sinn limitación, hipergammaglobulinemia, altos niveles de autoanticuerpos, depósitos complejos de antígeno-anticuerpo en los tejidos, ventajas de los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores, y agregados de células linfoides en los tejidos afectados. Sin limitarse a ninguna teoría con respecto a una enfermedad autoinmune mediada por células B, se cree que las células B muestran un efecto patogénico en enfermedades autoinmunes humanas a través de una multitud de rutas mecanísticas, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes, la activación dendrítica y células T, la síntesis de citoquinas, la liberación directa de quimiocinas, y proporcionando un nido de neo-linfogénesis ectópico. Cada una de estas rutas puede participar en diferentes grados en la patología de las enfermedades autoinmunes.

[0150] "Enfermedad autoinmune" puede ser una enfermedad específica de órgano (es decir, la respuesta inmune está específicamente dirigida contra un sistema orgánico, tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y hepáticos, el sistema renal, la tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémica (SLE), artritis reumatoide, polimiositis, etc.). Las enfermedades preferidas incluyen trastornos reumatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus, tales como SLE lupus nefritis, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, y artritis psoriática), trastornos autoinmunes gastrointestinales y trastornos hepáticos (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y enfermedad celiaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis negativa de ANCA y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, y poliangeitis microscópica), trastornos neutrológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonus mioclonus, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, sarpullidos, pemphigus vulgaris, penfigoide bulloso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura post-transfusión, y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveitis, enfermedades del ñido autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida del oído), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo,

enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes, tales como diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), enfermedad de Addison, y enfermedad de tiroides autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

[0151] Ejemplos específicos de otras enfermedades autoinmunes tal como se define aquí, que en algunos casos comprenden las indicadas anteriormente, incluyen, pero sin limitación, artritis (aguda y crónica, artritis reumatoide, incluyendo artritis reumatoide de aparición juvenil y fases, tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno de tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformans, poliartitis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por agotamiento de estrógeno, y enpondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), enfermedad autoinmune linfoproliferativa, enfermedades de la piel hiperproliferativa inflamatoria, psoriasis, tales como psoriasis de placas, psoriasis gutatta, psoriasis pustular, y psoriasis de las uñas, atopía, incluyendo enfermedad atópica, tales como alergia al polen y síndrome de Job, dermatitis, incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliante, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria, dermatitis herpetiformis, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria, y dermatitis atópica, síndrome de hiper-IgM asociado a x, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria, tales como urticaria alérgica crónica, y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmune crónica, miositis, polimiositis/dennatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémica), esclerosis, tales como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (MS), tal como MS espino-óptica, MS progresiva primaria (PPMS) y MS recurrente remitente (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por el sistema inmune, inflamación gastrointestinal, colitis, tales como colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, y colitis transmural, y enfermedad inflamatoria de intestino autoinmune), inflamación de intestino, pioderma gangrenosa, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de insuficiencia respiratoria, incluyendo síndromes de insuficiencia respiratoria adulta o aguda (ARDS), meningitis, inflamación de todo o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno autoinmune hematológico, enfermedad de injerto frente a huésped, angioedema, tales como angioedema hereditaria, daño nervioso craneal como en meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito de escroto, insuficiencia ovárica prematura inmune, pérdida repentina de oído debido a una patología autoinmune, enfermedades mediadas por IgE, tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, tales como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbico y/o tronco cerebral, uveitis, tal como uveitis anterior, uveitis anterior aguda, uveitis granulomatosa, uveitis no granulomatosa, uveitis faecoantigénica, uveitis posterior, o uveitis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónica o aguda, tales como GN primaria, GN mediada por el sistema inmune, HN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN de membrana o membranosa proliferativa (MPGN), incluyendo tipo I y tipo II, y GN rápidamente progresiva (RPGN), nefritis proliferativa, fallo endocrino poliglandular autoinmune, balanitis, incluyendo balanitis circumscripta plasmacellularis, balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidérmica, queratosis premaligna, pioderma gangrenosa, patologías y respuestas alérgicas, alergias a alimentos, alergias a fármacos, alergias a insectos, trastornos alérgicos raros, tales como mastocitosis, reacción alérgica, eczema, incluyendo eczema alérgico o atópico, eczema esteatósico, eczema dishidrótico y eczema palmoplantares vesicular, asma, tal como asma bronquial, y asma autoinmune, patologías que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos exógenos, tales como grupos de sangre A-B-O fetales durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus, incluyendo lupus nefritis, lupus cerebritos, lupus pediátrico, lupus no renales, lupus extrarenales, lupus discorde y lupus eritematoso discorde, lupus alopecia, SLE, tales como SLE cutáneo o SLE cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (NLE) y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus (tipo I) de aparición juvenil, incluyendo IDDM pediátrico, diabetes mellitus (diabetes tipo II) de aparición adulta, diabetes autoinmune, diabetes idiopática insípida, retinopatía diabética, nefropatía diabética, colitis diabética, trastorno diabético de arteria grande, respuestas inmune asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediadas por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de vaso sanguíneo grande, tal como poliarteritis reumática y arteritis de célula gigante (de Takayasu), vasculitis de vaso medio, tal como enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa, inmunovascularitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante, tal como vasculitis necrotizante fibrinoide y vasculitis necrotizante sistémico, vasculitis negativa de ANCA, y vasculitis asociada a ANCA, tal como síndrome de Churg-Strauss (CSS), granulomatosis de Wegener, y poliarteritis microscópica), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de diamante-blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune, incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia de glóbulos rojos puros o aplasia (PRCA), deficiencia del Factor VII, hemofilia A, neutropenia(s) autoinmune(s), citopenias, tales como pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de

lesión multiorgánica, tales como los secundarios a septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por el complejo de antígeno y anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, motoneuritis, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide o pénfigo, tal como penfigoide buloso, penfigoide cicatrizal (membrana mucosa), penfigoide de la piel, pénfigo vulgar, pénfigo paraneoplásico, pénfigo foliáceo, penfigoide de membrana mucosa, y pénfigo eritematoso, epidermolísis bullosa adquirida, inflamación ocular, preferiblemente inflamación ocular alérgica, tal como conjuntivitis alérgica, enfermedad bullosa de IgA lineal, inflamación conjuntival inducida por el sistema autoinmune, poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica debido a una patología autoinmune, preeclampsia, un trastorno complejo inmune, tal como nefritis complejo inmune, nefritis mediada por anticuerpo, trastornos neuroinflamatorios, polineuropatías de neuropatía crónica, tales como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (desarrollada por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura post-transfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenia autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo, por ejemplo, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluyendo ITP crónica o aguda, escleritis, tales como cerato escleritis idiopática, epiescleritis, enfermedad autoinmune de los testículos y ovario, incluyendo orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmune, incluyendo tiroiditis, tales como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad autoinmune de tiroides, hipotiroidismo idiopática, enfermedad de Grave, enfermedad de ojo de Grave (oftalmopatía o oftalmopatía asociada a tiroides), síndromes de poliglandulares, tales como síndromes poliglandulares autoinmunes, por ejemplo, tipo I (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos, tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre tieso o persona tiesa, encefalomielitis, tal como encefalomielitis alérgica o encefalomielitis alérgica y encefalomielitis alérgica experimental (EAE), miastenia gravis, tal como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclonus o síndrome de opsoclonus mioclonus (OMS) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de célula gigante, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, pneumonitis, tal como pneumonitis intersticial linfoide (LIP), bronquiolitis obliterans (no trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, dermatosis neutrofilica febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis, tal como cirrosis biliar primaria y pneumocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, celiaquía (enteropatía a gluten), esteatorrea refractaria, esteatorrea idiopática, crioglobulinemia, tal como crioglobulinemia mezclada, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad del oído autoinmune, tal como enfermedad del oído interno autoinmune (AIED), pérdida de audición autoinmune, policondritis, tal como policondritis refractaria o recidivante o recurrente, proteinosis alveolar pulmonar, queratitis tal como síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilitica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado a zóster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de células B monoclonales (por ejemplo, gammopatía monoclonal benigna y gammopatía monoclonal de significancia no determinada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías, tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o segmental o focal segmental (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, corioretinitis, trastorno hematológico autoinmune, fibromialgia, fallo endocrino múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia, areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debido a anticuerpos anti-espermatozoides, enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón del cuidador de aves, angitis granulomatosa alérgicas, angitis linfocíticas benigna, síndrome de Alport, alveolitis, tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad de pulmón intersticial, reacción de transfusión, lepra, malaria, enfermedad parasíticas, tales como leishmaniasis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, mediastinitis fibrosante, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, frosisis quística, endoftalmitis, eritema elevado diutinum, eritroblastos fetales, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis, tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (agua o crónica) o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) infección por ecovirus, sepsis (síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), endoloxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por virus de la rubeola, síndromes después de vacunación, infección por rubeola congénita, infección por virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis post-estreptococcal, tromboangitis obliterans, tirotoxicosis, tabes dorsalis, corioiditis, polimialgia de célula gigante, pneumonitis de hipersensibilidad crónica, conjuntivitis, tal como catarro vernal, queratoconjuntivitis sicca y queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítica idiopática, nefropatía de cambio mínimo, lesión por reperusión familiar benigna e isquemia, reperusión de órganos de trasplante, autoinmunidad retinal, inflamación de articulaciones, bronquitis, enfermedad pulmonar (vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, afta, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos (insuficiencia vascular

cerebral), tal como encefalopatía arteriosclerótica y retinopatía arteriosclerótica, aspermiogenesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-rich, pérdida de audición sensorineural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileitis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopática primaria, nefrosis, oftalmia simpática (oftalmítis simpática), oftalmítis neonatal, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, pancreatitis, poliradiculítis aguda, pioderma gangrenoso, tireoiditis de Quervain, atrofia escénica adquirida, timoma no maligno, tinitis linfocelular, vitiligo, síndrome de choque tóxico, envenamiento de alimentos, condiciones que implican la infiltración de células T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunes asociadas con una hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, síndrome de lesión multiorgánica, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primaria, gastritis atrófica autoinmune, enfermedades reumáticas, enfermedad de tejido conectivo mixto, síndrome nefrótico, insuficiencia poliendocrina, síndromes poliglandular autoinmunes, incluyendo síndrome poliglandular tipo 1, hipoparatiroidismo idiopático de aparición adulta (AOIH), cardiomiopatía, tal como cardiomiopatía dilatada, epidermolísis bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoide, frontal, maxilar o esferoide, sinusitis alérgica, un trastorno relacionado con eosinófilos, tal como eisonofilia, eosinofilia infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar trópica, aspergilosis broncopneumónico, aspergiloma o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartropatías, espondiloartritis seronegativa, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia telangiectasia, angiectasis, trastornos autoinmunes asociados con enfermedad de colágeno, reumatismo, tal como artroreumatismo crónico, linfadenitis, reducción en la respuesta de la presión sanguínea, disfunción vascular, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno de reperfusión isquémica, lesión por reperfusión de tejido miocárdico u otro tejido, traqueobronquitis linfática, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, fallo multiorgánico, enfermedades bullosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios ocular y orbital, síndromes asociados con transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación seria aguda, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera peptídica, valvulitis y endometriosis. Dichas enfermedades son contempladas aquí para tratarse mediante la administración de un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de células B, tal como CD79b, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado (“desnudo”) o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como se describe aquí. Dichas enfermedades también se contemplan aquí para tratarse mediante terapia de combinación incluyendo un anticuerpo anti-Cd79b o conjugado de anticuerpo anti-Cd79b y fármaco de la presente invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie.

[0152] “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren a tanto un tratamiento terapéutico como con medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico reconocido. Los necesitados del tratamiento incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno, así como aquéllos propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que debe prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es “tratado” satisfactoriamente para una cáncer que expresa el polipéptido CD79b si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-CD79b según los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-CD79b pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos y/o citotóxicos. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

[0153] Los parámetros anteriores para evaluar una tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante tests de estadificación y media escaneo óseo y tests de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la expansión hacia los huesos. Los escaneos CT también se pueden realizar para buscar la expansión hacia la pelvis y los nódulos linfáticos en el área. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se utilizan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

5 **[0154]** Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria mediante citoscopia, monitorización de la presencia de sangre en la orina, visualización del tracto urotelial mediante monografía o un pielograma intravenoso, tomografía computerizada (CT) e imagen por resonancia magnética (MRI). La presencia de metástasis distantes se puede evaluar mediante CT del abdomen, rayos X del pecho u obtención de imágenes por radionucleidos del esqueleto.

10 **[0155]** Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es cíclico por naturaleza.

15 **[0156]** Un "individuo" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja, tales como vacas, animales para eventos deportivos, animales domésticos (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un humano.

20 **[0157]** El término "mamífero" con el propósito de tratamiento, o alivio de los síntomas del cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

25 **[0158]** La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

30 **[0159]** "Portadores", tal como se utiliza aquí, incluyen los potadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos a la célula o al mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácido orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

40 **[0160]** Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliácilamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

45 **[0161]** Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un anticuerpo CD79b) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

50 **[0162]** Una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" se define en la presente invención por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

55 **[0163]** Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales para eventos deportivos, animales domésticos (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un humano.

60 **[0164]** El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica del principio activo para que sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

[0165] Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

65 **[0166]** Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo tal como se describe aquí es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de forma

rutinaria, en relación al objetivo indicado.

[0167] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o aliviar, en cierto grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de "tratamiento" en la presente invención. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, puede ser citostático o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0168] Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-CD79b es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-CD79b con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0169] Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-CD79b es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-CD79b con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0170] Una "célula que expresa CD79b" es una célula que expresa un polipéptido CD79b endógeno o transfectado en la superficie celular o en una forma secretada. Un "cáncer que expresa CD79b" es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido CD79b presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido CD79b. Un "cáncer que expresa CD79b" produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido CD79b en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-CD79b se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un "cáncer que expresa CD79b" produce y secreta opcionalmente niveles suficientes de polipéptido CD79b, de manera que un anticuerpo anti-CD79b antagonista se puede unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto a éste último, el antagonista puede ser un oligonucleótido no codificante que reduce, inhibe o evita la producción y la secreción del polipéptido CD79b secretado por células tumorales. Un cáncer que "sobrexprende" un polipéptido CD79b es aquel que tiene niveles significativamente más elevados de polipéptido CD79b en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión de polipéptido CD79b se puede determinar en un ensayo de detección o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína CD79b presente en la superficie de una célula, o secretada por la célula, (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-CD79b preparados contra un polipéptido CD79b aislado que se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido CD79b; análisis FACS, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido CD79b o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de hibridación *in situ* fluorescente utilizando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifica CD79b o el complemento del mismo; (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido CD79b midiendo el antígeno escindido en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase, también por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,933,294 concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; la Patente de estados unidos 5,401,638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos *in vivo* para el técnico experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante rastreo externo para la radioactividad o mediante en análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0171] Tal como se utiliza aquí, el término "inmuno adhesina", designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada y que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir es "heteróloga"), y de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidos IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0172] La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso del marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato detectables.

[0173] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca, alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina, u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíficos, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0174] Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

[0175] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación: agente alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas venenosas del huso mitótico, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de quinasa. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos utilizados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®), Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS No. 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly). PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS No. 15663-27-1), carboplatino (CAS No. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien-9-carboxamida, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®, y doxombicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, y rapamicina.

[0176] Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, WO 2007/044515). ARRY-886 (inhibidor de Mck. AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K. Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafamib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), getitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifamib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (Cremophor-free), formulaciones de nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®), Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y pipsulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meritredopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo alrelamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; GG-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostaza de nitrógeno, tal como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimitstina, y ranimustina; antibióticos, tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma I II, caliqueamicina omega II (Angcw Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxonibicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de Purina, tales

como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomilhina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitro de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rhizoxin; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODAL®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

[0177] También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regulan la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanic, fadrozol, RIVISOR® (vorozole), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido de citosina); (iv) inhibidores de proteína quinasa, tales como inhibidores MEK (WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en los mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras, tales como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como vacunas por terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos, tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

[0178] También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" los anticuerpos terapéuticos, tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERGEPITIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia), y el conjugado de anticuerpo y fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

[0179] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa CD79b, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan CD79b en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

[0180] "Doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

[0181] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que

actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0182] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

[0183] El término "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica en una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático, tal como la división proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o la hidrólisis de un grupo funcional, tal como una hidrazina, éster o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado división intracelular después de la entrada, difusión, captación o transporte en una célula.

[0184] Los términos "divididos intracelularmente" y "division intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica en una célula en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), por el cual se rompe la unión covalentemente, es decir, un enlazador, entre el grupo farmacológico (D) y el anticuerpo (Ab), dando lugar a un fármaco libre disociado del anticuerpo dentro de la célula. Los grupos divididos del ADC son por tanto metabolitos intracelulares.

[0185] El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (velocidad) como la cantidad total (grado) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una forma de dosificación administrada.

[0186] El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto inhibidor de la histólisis, citostático o del crecimiento de un ADC o un metabolito intracelular de un ADC. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor IC50 que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de células.

[0187] El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un radical hidrocarburo monovalente saturado de cadena lineal o ramificada de uno a doce átomos de carbono (C1-C12), en la que el radical alquilo puede estar opcionalmente sustituido independientemente por uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otra realización, un radical alquilo tiene de uno a ocho átomos de carbono (C1-C8) o de uno a seis átomos de carbono (C1-C6). Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃), 1-heptilo, 1-octilo, y similares.

[0188] El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C2-C8) con por lo menos un punto de insaturación, es decir un doble enlace carbono-carbono sp², donde el radical alqueno puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes aquí descritos, e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Ejemplos incluyen, pero sin limitación, etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), y similares.

[0189] El término "alquino" se refiere aun radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a ocho

átomos de carbono (C2-C8) con por lo menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono sp., donde el radical alquínico puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes aquí descritos. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargilo, $-CH_2C\equiv CH$), y similares.

[0190] Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "anillo carbocíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un anillo monovalente no aromático saturado o parcialmente insaturado que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (C3-C12) como anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos de carbono se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 ó 10 átomos en el anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] ó [6,6], o como sistemas puente, tales como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Entre los ejemplos de carbociclos monocíclicos se incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo, y similares.

[0191] "Ariolo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (C6-C20) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema anular aromático parental. Algunos grupos arilos se representan en las estructuras de ejemplo como "Ar". Ariolo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos ariolo habituales incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, y similares. Los grupos ariolo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos aquí.

[0192] Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se utilizan indistintamente en la presente invención y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más dobles y/o triples enlaces en el anillo) de 3 a 20 átomos en el anillo, en que por lo menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, siendo el resto de átomos en el anillo C, donde uno o más átomos en el anillo está independientemente opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes descritos a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros en el anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros en el anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 6 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta el presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; and J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales, donde los radicales heterociclo se fusionan con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o un anillo heterocíclico o carbocíclico aromático. Ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorpholinilo, tiofanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditiolanilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolil quinolizino y N-piridil ureas. Los grupos espiro también se incluyen en el alcance de esta definición. Ejemplos de un grupo heterocíclico donde 2 átomos de carbono en el anillo están sustituidos con grupos oxo ($=O$) son pirimidinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. Los grupos heterociclo están independientemente opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes aquí descritos.

[0193] El término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5, 6 ó 7 miembros e incluye sistemas anulares fusionados (por lo menos uno de los cuales es aromático) de 5-20 átomos, que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluyendo, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizino, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, y furopiridinilo. Los grupos heteroarilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes aquí descritos.

[0194] Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos a carbono o nitrógeno cuando esto sea posible. A modo de ejemplo no limitante, los heterociclos o heteroarilos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5, ó 6 de una piridina, la posición 3, 4, 5, ó 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5, ó 6 de una pirimidina, la posición 2, 3, 5, ó 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4, ó 5 de un furano, tetrahidrofuranilo, tiofurano, tiofeno, pirrol, o tetrahidropirrol, la posición 2, 4, ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4, ó 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, la posición 2 ó 3 de una aziridina, la posición 2, 3, ó 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de

una quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, ó 8 de una isoquinolina.

[0195] A modo de ejemplo no limitante, los heterociclos o heteroarilos unidos a nitrógeno se unen en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, la posición 4 de una morfolina, y la posición 9 de un carbazol, o β -carbolina.

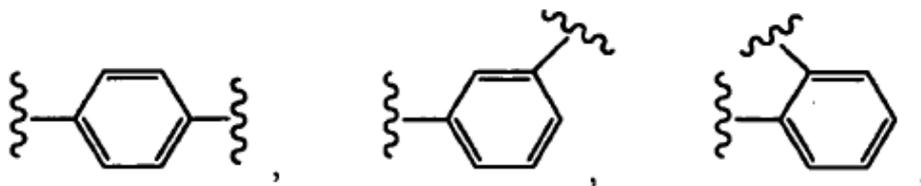
[0196] "Alquileno" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico, saturado, de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alcano parental. Los radicales alquileno habituales incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH₂-), 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), y similares.

[0197] Un "alquileno C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo de cadena lineal saturado de fórmula -(CH₂)₁₋₁₀. Ejemplos de alquileno C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

[0198] "Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal, ramificada o cíclico insaturado de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alqueno parental. Los radicales alquenileno habituales incluyen, pero sin limitación: 1,2-etileno (-CH=CH-).

[0199] "Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico insaturado de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono iguales o diferentes de un alquino parental. Los radicales alquinileno habituales incluyen, pero sin limitación: acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-), y 4-pentileno (-CH₂CH₂CH₂C≡C-).

[0200] Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta o para mostradas en las siguientes estructuras:



en que el grupo fenilo puede estar no sustituido o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo -C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo -C₁-C₈ y arilo.

[0201] "Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, habitualmente un átomo de carbono terminal o sp³, está sustituido por un radical arilo. Grupos arilalquilo habituales incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el grupo alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo de 1 a 6 átomos de carbono y el grupo arilo de 5 a 14 átomos de carbono.

[0202] "Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, habitualmente un átomo de carbono terminal o sp³, está sustituido por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo habituales incluyen, pero sin limitación, 2-benzimidazolilmetilo, 2-furiletilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el grupo alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo de 1 a 6 átomos de carbono y el grupo heteroarilo de 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. El grupo heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

[0203] El término "profármaco", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de un compuesto de la invención que puede ser menos citotóxico a las células en comparación con el compuesto o fármaco principal y es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente o hidrolíticamente en la forma principal más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp.

375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivar en una forma profármaco para utilizar en esta invención incluyen, pero sin limitación, compuestos de la presente invención y agents quimioterapéuticos tales como los descritos anteriormente.

[0204] Un "metabolito" es un producto producido a través del metabolismo en el organismo de un compuesto específico o sal del mismo. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar utilizando técnicas de rutina conocidas en el sector y sus actividades se determinan utilizando análisis, tales como los descritos aquí. Dichos productos pueden resultar de, por ejemplo, la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, separación enzimática, y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la presente invención incluye metabolitos de compuestos de la presente invención, incluyendo compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

[0205] Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0206] "Enlazador" se refiere a un grupo químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un grupo farmacológico. En varias realizaciones, los enlazadores incluyen un radical bivalente, tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, grupos tales como: $-(CR^2)_nO(CR^2)_n-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo polietilenoamino, Jeffamine™); y éster y amidas de diácido incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

[0207] El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse con su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se superponen a su imagen especular.

[0208] El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tiene una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

[0209] "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar bajo procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

[0210] "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto cuyas imágenes especulares no se superponen.

[0211] Las definiciones y convenciones esereoquímicas utilizadas en la presente invención siguen en general S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary de Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry de Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, presentan la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada por el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se utilizan para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se utilizan para designar el signo de rotación de luz polarizada por el plano por el compuesto, con (-) o l significando que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química determinada, estos estereoisómeros son idénticos a excepción de que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede referir como un enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina a menudo como una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se refiere como una mezcla racémica o un racemato, que puede tener lugar cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

[0212] El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de diferente energía que son convertibles a través de una barrera baja de energía. Por ejemplo, los tautómeros de protón (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones a través de la migración de un protón, tal como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante la reorganización de algunos de los electrones de unión.

[0213] La frase "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza aquí, se refiere a sales orgánicas o

inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la presente invención. Entre las sales de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, y pamoato

[0214] (es decir, 1,1'-metilen-bis(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier grupo orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Ejemplos donde múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

[0215] Si el compuesto de la presente invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa-hidroxiácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

[0216] Si los compuestos de la presente invención son un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

[0217] La frase "farmacéuticamente aceptables" indica que la sustancia o composición debe ser compatible químicamente y/o toxicológicamente con los otros ingredientes que comprenden una formulación y/o el mamífero que está siendo tratado con los mismos.

[0218] Un "solvato" se refiere a una asociación o complejo de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Ejemplos de disolventes que forman solvatos incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina. El término "hidrato" se refiere al complejo en el que la molécula de disolvente es agua.

[0219] El término "grupo protector" se refiere a un sustituyente que se utiliza habitualmente para bloquear o proteger una funcionalidad concreta cuando reacciona otros grupos funcionales en los compuestos. Por ejemplo, "un grupo protector de amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Entre los grupos protectores de amino adecuados se incluyen, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetileno-oxycarbonilo (Fmoc). De manera similar, un "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un sustituyente de un grupo hidroxilo que bloquea o protege la funcionalidad hidroxilo. Los grupos protectores adecuados incluyen acetilo y sililo. Un "grupo protector de carboxi" se refiere a un sustituyente del grupo carboxi que bloquea o protege la funcionalidad carboxi. Los grupos protectores de carboxi habituales incluyen fenilsulfonietilo, cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, 2-(p-toluenosulfonil)etilo, 2-(p-nitrofenilsulfenil)etilo, 2-(difenilfosfino)-etilo, nitroetilo y similares. Para una descripción general y sus usos, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, New York, 1991.

[0220] "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que se puede sustituir por otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes son bien conocidos en la técnica y ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

[0221] COMPONENTES ENLAZADORES:

MC = 6-maleimidocaproilo

Val-Cit o "vc" = valina-citulina (un dipéptido de ejemplo en un enlazador divisible por proteasa)

Citrullina = ácido 2-amino-5-ureido pentanoico

PAB = p-aminobenciloxicarbonilo (un ejemplo de un componente enlazador "auto inmolativo")

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citulina (donde el enlace peptídico del enlazador ha sido modificado para evitar su

división por la catepsina B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproilo- polietilenglicol (se puede unir a cisteínas de anticuerpo).

MMAE = mono-metil auristatina E (PM 718)

MMAF = variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C-terminal del fármaco (PM 731,5)

5 MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en una unión amida en la fenilalanina C-terminal (PM 801,5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado en la fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, unido como una amida en C-terminal de MMAF

DM1 =N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina

10 DM3 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina

DM4 = N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

[0222] Más abreviaturas son las siguientes: AE es auristatina E, Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEAR es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilanunopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida a presión elevada, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1S,2R)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo tris-pirrolidino fosfonio, SEQ es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoracético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta, y val es valina.

[0223] Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido de cisteína que se ha diseñado en un anticuerpo principal, tiene un grupo funcional tiol (-SH), y no está emparejado como un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

[0224] El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo modificado con cisteínas que reacciona con un reactivo que reacciona con tiol y se convierte a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo modificado con cisteína que reacciona en un rendimiento del 100% con un reactivo que reacciona con tiol, tal como un reactivo de biotina-maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad de tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína diseñado en el mismo anticuerpo original (parental) o diferente que reacciona en un rendimiento del 80% con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína diseñado en el mismo anticuerpo original (parental) o diferente que no consigue reaccionar nada con un reactivo que reacciona con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0. La determinación del valor de tiol de una cisteína particular se puede realizar mediante un ensayo ELISA, espectrometría de masas, cromatografía de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otros tests analíticos cuantitativos.

[0225] Un "anticuerpo original (parental)" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cual se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo original puede comprender una secuencia nativa o de tipo salvaje. El anticuerpo original puede tener modificaciones preexistentes en la secuencia de aminoácidos (tales como, adiciones, deleciones, y/o sustituciones) en relación con otras formas nativas, tipo salvaje o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo original puede estar dirigido contra un antígeno diana de interés, por ejemplo un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos de glicolípidos asociados a tumor; véase US 5091178).

Tabla I

```

5      /*
      *
      * C-C increased from 12 to 15
      * Z is average of EQ
      * B is average of ND
      * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
10     */
      #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

      int      _day[26][26] = {
15     /* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
      /* A */      { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
      /* B */      { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
      /* C */      {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
      /* D */      { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
      /* E */      { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
20     /* F */      {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
      /* G */      { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
      /* H */      {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
      /* I */      {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
      /* J */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
25     /* K */      {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
      /* L */      {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
      /* M */      {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
      /* N */      { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
30     /* O */      { _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
      /* P */      { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
      /* Q */      { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
      /* R */      {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
      /* S */      { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
35     /* T */      { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
      /* U */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
      /* V */      { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
      /* W */      {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
      /* X */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
40     /* Y */      {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
      /* Z */      { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
      };

```

45

50

55

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO       8       /* penalty for a gap */
#define DINSI       1       /* penalty per base */
#define PINSO       8       /* penalty for a gap */
#define PINSI       4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score;          /* score at last jmp */
    long     offset;        /* offset of prev block */
    short    ijmp;          /* current jmp index */
    struct jmp jp;          /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc;            /* number of leading spaces */
    short    n[JMPS];       /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPS];       /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char      *ofile;          /* output file name */
char      *namex[2];       /* seq names: getseqs() */
char      *prog;           /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2];        /* seqs: getseqs() */
int      dmax;             /* best diag: nw() */
int      dmax0;           /* final diag */
int      dna;              /* set if dna: main() */
int      endgaps;         /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy;       /* total gaps in seqs */
int      len0, len1;       /* seq lens */
int      ngapx, ngapy;     /* total size of gaps */
int      smax;             /* max score: nw() */
int      *xbm;            /* bitmap for matching */
long     offset;          /* current offset in jmp file */
struct    diag            /* holds diagonals */
struct    path            /* holds path for seqs */

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

65

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2[(1<<('D'-'A'))(1<<('N'-'A'))], 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25[(1<<('E'-'A'))(1<<('Q'-'A'))]
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();         /* get the actual jmps */
    print();            /* print stats, alignment */

    cleanup(0);         /* unlink any tmp files */
}

```

main

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
5  * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw() nw
10 {
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;   /* keep track of delx */
    int       *tmp;         /* for swapping row0, row1 */
15  int       mis;          /* score for each type */
    int       ins0, ins1;   /* insertion penalties */
    register  id;           /* diagonal index */
    register  ij;           /* jmp index */
    register  *col0, *col1; /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;       /* index into seqs */
20
    dx = (struct diag *)g_alloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_alloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_alloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_alloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
25  col1 = (int *)g_alloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
30      for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
          col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
          ndely[yy] = yy;
      }
      col0[0] = 0;      /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
35  else
      for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
          dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
40  for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
45          if (xx == 1)
              col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
          else
              col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
          ndelx = xx;
        }
        else {
50          col1[0] = 0;
          delx = -ins0;
          ndelx = 0;
        }
    }
55
60
65

```

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongoing del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongoing del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

  id = xx - yy + len1 - 1;
  if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;

```

...nw

```

5         else if (delx >= dely[yy]) {
            coll[yy] = delx;
            ij = dx[id].ijmp;
            if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
10         && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                dx[id].ijmp++;
                if (++ij >= MAXJMP) {
                    writejmps(id);
                    ij = dx[id].ijmp = 0;
                    dx[id].offset = offset;
                    offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
15         }
            }
            dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = delx;
20     }
        else {
            coll[yy] = dely[yy];
            ij = dx[id].ijmp;
25     if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                dx[id].ijmp++;
                if (++ij >= MAXJMP) {
                    writejmps(id);
                    ij = dx[id].ijmp = 0;
                    dx[id].offset = offset;
                    offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
30         }
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely[yy];
35     }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
40         if (coll[yy] > smax) {
                smax = coll[yy];
                dmax = id;
            }
        }
50     }
        if (endgaps && xx < len0)
            coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (coll[yy-1] > smax) {
55         smax = coll[yy-1];
            dmax = id;
        }
    }

        tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
    }

60     (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);

        (void) free((char *)coll);
    }
65

```

```

5  /*
   *
   * print() -- only routine visible outside this module
   *
   * static:
10  * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
   * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
   * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
   * nums() -- put out a number line: dumpblock()
   * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
15  * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
   * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
   */

#include "nw.h"

20  #define SPC      3
   #define P_LINE  256 /* maximum output line */
   #define P_SPC   3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
25  int  olen; /* set output line length */
FILE  *fx; /* output file */

print()
{
30  int  lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

   if((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
       fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
       cleanup(1);
   }
35  fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], lcn0);
   fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
   olen = 60;
   lx = len0;
   ly = len1;
40  firstgap = lastgap = 0;
   if(dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
       pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
       ly -= pp[0].spc;
   }
45  else if(dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
       pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
       lx -= pp[1].spc;
   }
   if(dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
50  lastgap = len0 - dmax0 - 1;
       lx -= lastgap;
   }
   else if(dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
       lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
       ly -= lastgap;
55  }
   gctmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
       pr_align();
}
60

65

```

print

```

5  /*
   * trace back the best path, count matches
   */
   static
   getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
10      int      lx, ly;                                          /* "core" (minus endgaps) */
      int      firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
   {
15      int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
      char      outx[32];
      double    pct;
      register  n0, n1;
      register  char *p0, *p1;
      /* get total matches, score
       */
      i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
      p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
      p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
      n0 = pp[1].spc + 1;
      n1 = pp[0].spc + 1;
      nm = 0;
25      while ( *p0 && *p1 ) {
          if (siz0) {
              p1++;
              n1++;
              siz0--;
          }
          else if (siz1) {
30              p0++;
              n0++;
              siz1--;
          }
          else {
35              if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                  nm++;
              if (n0++ == pp[0].x[i0])
                  siz0 = pp[0].n[i0++];
              if (n1++ == pp[1].x[i1])
                  siz1 = pp[1].n[i1++];
40              p0++;
              p1++;
          }
      }
45      /* pct homology:
       * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
       * else, knock off overhangs and take shorter core
       */
      if (endgaps)
50          lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
      else
          lx = (lx < ly)? lx : ly;
      pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
      fprintf(fx, "\n");
55      fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
              nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
60
65

```

```

5
    fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
    if (gapx) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
10         ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
            (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
15         ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
            fprintf(fx, "%s", outx);
        }
        if (dna)
            fprintf(fx,
20         "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
            fprintf(fx,
25         "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
            fprintf(fx,
30         "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
            fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
    }
    static nm;          /* matches in core -- for checking */
    static lmax;       /* lengths of stripped file names */
    static ij[2];      /* jmp index for a path */
    static nc[2];      /* number at start of current line */
    static ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
    static siz[2];
    static char *ps[2]; /* ptr to current element */
    static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
    static char out[2][P_LINE]; /* output line */
    static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
    /*
    * print alignment of described in struct path pp[]
    */
    static
45 pr_align()
    {
        int nn;          /* char count */
        int more;
        register i;

50     for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nm = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
65     }
        po[i] = out[i];
    }

```

...getmat

pr_align

5

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

...dumpblock

nums

putline

```

(void)putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register char i, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void)putc(*pn, fx);
    (void)putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

...putline

```

5      int          i;
      register char *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void) putchar(*px, fx);
10     for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putchar(' ', fx);

      /* these count from 1:
      * ni[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
      */
15     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putchar(*px&0x7F, fx);
      (void) putchar('\n', fx);
    }

20     /*
      * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
      */
      static
25     stars()
    {
        int          i;
        register char *p0, *p1, cx, *px;

30         if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *(po[0]) == '') ||
            !*out[1] || (*out[1] == '' && *(po[1]) == ''))
            return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
35             *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
            if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

40                 if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                    cx = '*';
                    nm++;
                }
                else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                    cx = '!';

45                 else
                    cx = ' ';
            }
            else
                cx = ' ';
            *px++ = cx;
50         }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
    }

```

stars

55

60

65

```
5  /*
   * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
   */
   static
   stripname(pn)
10  {
       char    *pn;    /* file name (may be path) */
       register char    *px, *py;

       py = 0;
       for (px = pn; *px; px++)
15         if (*px == '/')
             py = px + 1;
       if (py)
           (void) strcpy(pn, py);
       return(strlen(pn));
20  }
```

stripname

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

5
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
10 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

15 char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;
int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();
/*
20 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i;
25 {
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
30 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ':', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
35 getseq(file, len)
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
60
65

```

cleanup

getseq

...getseq

```

5      py = pseq + 4;
      *len = tlen;
      rewind(fp);
      while (fgets(line, 1024, fp) != NULL) {
          if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
              continue;
          for (px = line; *px != '\n'; px++) {
10             if (isupper(*px))
                 *py++ = *px;
             else if (islower(*px))
                 *py++ = toupper(*px);
             if (index("ATGCU", *(py-1)))
                 natgc++;
          }
      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (tlen/3);
      return(pseq+4);
}
char *
25 g_alloc(msg, nx, sz)
      char *msg;          /* program, calling routine */
      int nx, sz;        /* number and size of elements */
{
      char *px, *calloc();
      if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
30         if (*msg) {
             fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
             exit(1);
         }
      }
      return(px);
}
/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
40 readjmps()
{
      int fd = -1;
      int siz, i0, i1;
      register i, j, xx;
      if (!i) {
45         (void) fclose(f);
         if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
             fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
             cleanup(1);
         }
      }
      for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
          while (1) {
50             for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

g_alloc

readjmps

55

60

65

```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

...readjumps

if (j < 0 && dx[dmax].offset && !j) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
}
else
    break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1 */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jumps */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (!fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
5  writejumps(ix) writejumps
    int    ix;
    {
        char    *mktemp();
10         if (!fj) {
            if (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
15                 fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
20         (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
    }

```

III. Composiciones y Métodos de la presente invención

25 **[0226]** La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b o fragmentos funcionales de los mismos, y sus métodos de uso en el tratamiento de tumores hematopoyéticos.

30 **[0227]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, incluyendo fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diabody, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido CD79b a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, una auristatina, un maitansinoide, un derivado de dolostatina o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de detección, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar de forma detectable, unirse a un soporte sólido, o similares.

40 **[0228]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad monovalente del anticuerpo a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab fragment a CD79b) es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab a CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab a CD79b), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada representadas en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y Figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14).

50 **[0229]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento Fab a CD79b) es superior, por ejemplo por lo menos 1, 2 ó 3 veces superior, a la afinidad monovalente de un anticuerpo murino (por ejemplo, afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab a CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab a CD79b), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y Figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14).

60 **[0230]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo afinidad del anticuerpo como un un fragmento de IgG a CD79b) es sustancialmente la misma que la afinidad de un anticuerpo murino (por ejemplo afinidad del anticuerpo murino como un fragmento de IgG a CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento de IgG a CD79b) en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y Figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14).

65 **[0231]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la

afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo afinidad del anticuerpo como un fragmento de IgG a CD79b) es superior, por ejemplo por lo menos 1, 2 ó 3 veces superior, que la afinidad de un anticuerpo murino (por ejemplo afinidad del anticuerpo murino como un fragmento de IgG a CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab a CD79b) en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y Figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14).

[0232] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 2,0 nM. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 2,0 nM +/- 0,5.

[0233] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 1 nM o mejor. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 1,5 nM o mejor. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 2 nM o mejor. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG para CD79b) es 2,5 nM o mejor. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 3 nM o mejor. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es entre 1 nM y 3 nM. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es entre 1,5 nM y 2,5 nM. En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es entre 1,75 nM y 2,25 nM.

[0234] En un aspecto, la afinidad monovalente del anticuerpo murino a CD79b es sustancialmente la misma que la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias de dominio variable de SEQ ID NO: 10 (Figuras 7A-B) y SEQ ID NO: 14 (Figuras 8A-B). En otro aspecto, la afinidad monovalente del anticuerpo murino a CD79b es sustancialmente la misma que la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias del dominio variable de un anticuerpo generado a partir del hibridoma depositado con la ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006 o anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables del anticuerpo generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

[0235] Tal como se establece en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando cualquier de un conjunto de ensayos, y se expresa en términos de un conjunto de valores cuantitativos. Por consiguiente, en una realización, la afinidad de unión se expresa como valores Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). En general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide in vitro, ya sea libre o asociado con células. Tal como se ha descrito con mayor detalle aquí, la diferencia en número de veces en la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la proporción del valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma Fab) y el valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/comparador (por ejemplo, en forma Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias de regiones hipervariables), donde los valores de afinidad de unión se determinan bajo condiciones de ensayo similares. De este modo, en una realización, la diferencia en número de veces se determina como la proporción de los valores Kd del anticuerpo humanizado en forma Fab y dicho anticuerpo Fab de referencia/comparador. Por ejemplo, en una realización, si un anticuerpo de la presente invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces inferior" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces si el valor Kd para A es 3x, el valor Kd de M sería 1x, y la proporción de Kd de A con respecto a Kd de M sería 3:1. En cambio, en una realización, si un anticuerpo de la presente invención (C) tiene una afinidad que es "3 veces superior" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces si el valor Kd para C es 1x, el valor Kd de R sería 3x, y la proporción de Kd de C con respecto a Kd de R sería 1:3. Se puede utilizar cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí, para obtener mediciones de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

[0236] Se describe en el presente documento un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende:

(a) por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas del grupo que consiste en:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, en la que A1-A15 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 59);

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 60);

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es WQGTHFPYT (SEQ ID NO: 61);

- (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 62);
 (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 63) y
 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F10 es ARNLYL (SEQ ID NO: 64).

En una realización, HVR-L1 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59. En una realización, HVR-L2 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60. En una realización, HVR-L3 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61. En una realización, HVR-H1 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 62. En una realización, HVR-H2 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63. En una realización, HVR-H3 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 64. En una realización, un anticuerpo como se indica antes que comprende estas secuencias (en combinación tal como se describe aquí) es humanizado o humano.

[0237] Se describe en el presente documento un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende:

(a) por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas del grupo que consiste en:

- (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, en la que A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 59);
 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 60);
 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es WQGTHFPYT (SEQ ID NO: 61);
 (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 62);
 (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 63) y
 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F10 es ARNLYL (SEQ ID NO: 64).

(b) por lo menos una variante de HVR en la que la secuencia de la variante de HVR comprende una modificación de por lo menos un residuo de la secuencia representada en SEQ ID NOs: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64. En una realización, HVR-L1 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59. En una realización, HVR-L2 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60. En una realización, HVR-L3 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61. En una realización, HVR-H1 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 62. En una realización, HVR-H2 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63. En una realización, HVR-H3 de un anticuerpo como se indica antes comprende la secuencia de SEQ ID NO: 64. En una realización, un anticuerpo como se indica antes que comprende estas secuencias (en combinación tal como se describe aquí) es humanizado o humano.

[0238] También se describe en el presente documento un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 59, 60, 61, 62, 63, y 64, y donde SEQ ID NO: 59 corresponde a una HVR-L1, SEQ ID NO: 60 corresponde a HVR-L2, SEQ ID NO: 61 corresponde a una HVR-L3, SEQ ID NO: 62 corresponde a una HVR-H1, SEQ ID NO: 63 corresponde a una HVR-H2 y SEQ ID NO: 64 corresponde a una HVR-H3. En una realización, un anticuerpo como se indica antes comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, donde cada una, en orden, comprende SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 y 64.

[0239] Las variantes de HVR en un anticuerpo como se indica antes puede tener modificaciones de uno o más residuos en la HVR. En una realización, una variante de HVR-L13 comprende 1-2 (1 ó 2) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: C1 (F) y C8 (F). La letra o letras en paréntesis después de cada posición indica un aminoácido de sustitución ilustrativo (es decir, una sustitución); tal como será evidente para un experto en la materia, la adecuabilidad de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto descrito aquí se puede evaluar de forma rutinaria utilizando técnicas conocidas en el sector y/o descritas aquí. En una realización, C1 en una variante de HVR-L3 es F. En una realización, C8 en una variante de HVR-L3 es F. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de HVR-L3 en la que C1 es F y C8 es F.

[0240] Un anticuerpo de la presente invención comprende una variante de HVR-L3 donde C1 es F y C8 es F. Dicho anticuerpo con variante de HVR-L3 comprende además HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEQ ID NOs: 59, 60, 62, 63 y 64. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera humana.

[0241] De este modo, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende la secuencia de HVR representada en la figura 9 (SEQ ID NO: 18).

[0242] Un agente terapéutico para utilizar en un sujeto huésped produce preferiblemente una respuesta inmunogénica de nula a escasa contra el agente en dicho sujeto. En una realización, la presente invención

proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) a un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y 14 en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta mínima o nula de anticuerpo humano anti-ratón. En un ejemplo, un anticuerpo de la presente invención produce una respuesta de anticuerpo antiratón que está o es inferior a un nivel clínicamente aceptable.

[0243] Un anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender una o más secuencias de la región no hipervariable humanas y/o de consenso humanas (por ejemplo, armazón) en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas realizaciones, están presentes una o más modificaciones adicionales en las secuencias de la región no hipervariable humana y/o de consenso humana. En una realización, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprende una secuencia de armazón de consenso humano, que en una realización es la secuencia de armazón de consenso del subgrupo III. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una secuencia de armazón de consenso del subgrupo III variante modificado en por lo menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una realización, una secuencia del armazón de consenso del subgrupo III variante puede comprender una sustitución en una o más posiciones 71, 73 y/o 78. En una realización, dicha sustitución es R71A, N73T y/o L78A, en cualquier combinación de los mismos.

[0244] Tal como se conoce en la técnica, y se describe con mayor detalle aquí a continuación, la posición de aminoácido/límite que define una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de varias definiciones conocidas en la técnica (tal como se describe a continuación). Algunas posiciones en un dominio variable se pueden observar como posiciones hipervariables híbridas en que estas posiciones se pueden estimar que están en una región hipervariable bajo un grupo de criterios mientras que se estima que están fuera de una región hipervariable bajo un grupo diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también se pueden hallar en regiones hipervariables extendidas (tal como se define a continuación). La presente invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una realización, estas posiciones hipervariables incluyen una o más posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 y 101-102 en un dominio variable de cadena pesada. En una realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 56 y 97 en un dominio variable de cadena ligera. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una secuencia armazón de consenso del subgrupo humano variante modificada en una o más posiciones hipervariables híbridas.

[0245] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una variante de la secuencia de armazón de consenso del subgrupo III humano modificada en una o más de las posiciones 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 y 101.

[0246] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una variante de la secuencia armazón de consenso del subgrupo I kappa humana modificada en una o más de las posiciones 24, 27-29, 56 y 97.

[0247] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una variante de la secuencia de armazón de consenso del subgrupo III humano modificada en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o todas las posiciones 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 y 101. En algunas realizaciones de la invención un anticuerpo de la presente invención comprende una variante de la secuencia de armazón de consenso del subgrupo III humano modificada en la posición 71, 73 y/o 78. En una realización, dicha sustitución es R71A, N73T y/o L78A.

[0248] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una variante de la secuencia armazón de consenso del subgrupo I kappa humana modificada en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 o todas las posiciones 24, 27-29, 56 y 97.

[0249] Un anticuerpo de la presente invención puede comprender cualquier secuencia de armazón de cadena ligera humana o de consenso humana, siempre que el anticuerpo muestre las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende por lo menos una parte (o toda) de la secuencia armazón de cadena ligera κ humana. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende por lo menos una parte (o toda) de la secuencia armazón de consenso del subgrupo I κ humana.

[0250] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que comprende secuencia armazón representada en SEQ ID NO: 9 (Figura 7) y/o 13 (Figuras 8A-B).

[0251] En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo anti-CD79b humanizado conjugado a un agente citotóxico. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD79b humanizado conjugado a un agente citotóxico inhibe la progresión tumoral en xenoinjertos.

[0252] En un aspecto, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una realización, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico comprenden una única región Fab unida a una región Fc. En una realización, el anticuerpo quimérico de referencia comprende secuencias de dominio variable representadas en la figura 7 (SEQ ID NO: 10) y Figuras 8A-B (SEQ ID NO: 14) unidas a una región Fc humana. En una realización, la región Fc humana es la de una IgG (por ejemplo, IgG1, 2, 3 ó 4).

[0253] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias HVR1-HG, HVR2-HC y/o HVR3-HC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 31-33). En una realización, el dominio variable comprende las secuencias FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 27-30). En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias CH1 y/o Fc representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 34 y/o 35). En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, SEQ ID NO: 31-33), y las secuencias FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC (Figura 13, SEQ ID NO: 27-30). En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, SEQ ID NO: 31-33), y las secuencias CH1 y/o Fc representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 34-35). En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, SEQ ID NO: 31-33), y las secuencias FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC (Figura 13, SEQ ID NO: 27-30), y las secuencias CH1 y/o Fc (Figura 13, SEQ ID NO: 34-35).

[0254] En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 23-25). En una realización, el dominio variable comprende las secuencias FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC representadas en la figura 13 (SEQ ID NO: 19-22). En una realización, el anticuerpo comprende la secuencia CL1 representada en la figura 13 (SEQ ID NO: 26). En una realización, el anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (SEQ ID NO: 23-25), y las secuencias FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC (SEQ ID NO: 19-22) representadas en la figura 13. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (SEQ ID NO: 23-25), y la secuencia CL1 (SEQ ID NO: 26) representada en la Figura 13. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (SEQ ID NO: 23-26), y las secuencias FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC (SEQ ID NO: 19-22) representadas en la figura 13, y la secuencia CL1 representada en la figura 13 (SEQ ID NO: 26).

[0255] En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos modificados con cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental son sustituidos por un aminoácido de cisteína libre tal como se describe en WO2006/034488; US 2007/0092940. Se puede modificar, es decir, mutar, de este modo cualquier forma de anticuerpo anti-CD79b. Por ejemplo, se puede modificar un fragmento Fab de anticuerpo parental para formar un Fab modificado con cisteína, referido en la presente como "TioFab." De manera similar, se puede modificar un anticuerpo monoclonal parental para formar un "TioMab". Cabe indicar que una mutación de sitio único produce un único residuo de cisteína modificado en un TioFab, mientras que una mutación de sitio único produce dos residuos de cisteína modificadas en un TioMab, debido a la naturaleza dimerica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferencialmente a polipéptidos CD79b asociados a la célula. Un anticuerpo modificado con cisteína puede comprender alternativamente un anticuerpo que comprende una cisteína en una posición descrita aquí en el anticuerpo o Fab, resultante del diseño de la secuencia y/o la selección del anticuerpo, sin alterar necesariamente un anticuerpo parental, tal como mediante el diseño y selección de anticuerpos con expresión de fagos o a través de un diseño nuevo de las secuencias de armazón y regiones constantes de cadena ligera y/o cadena pesada. Un anticuerpo modificado con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre que tiene un valor de reactividad de tiol en los intervalos de 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0 ó 0,8 a 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que ha sido modificado en el anticuerpo parental y no es parte de un puente disulfuro. Los anticuerpos modificados con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos y/o para la obtención de imágenes en el sitio de la cisteína modificada a través de, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad de tiol de un residuo de cys a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superiores en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácidos en una proteína, tal como un grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad específica de tiol en los reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH superiores (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

[0256] En un aspecto, un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas de la presente invención comprende una cisteína modificada en cualquiera de las siguientes posiciones, donde la posición se numera según Kabat et al. en la cadena ligera (véase Kabat et al (1991) Sequences de Proteins de Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD) y según la numeración EU en la cadena pesada (incluyendo la región Fc) (véase Kabat et al. (1991), supra), donde la región constante de cadena ligera representada por el subrayado en las figuras 17A y 18A, empieza en la posición 109 (numeración Kabat) y la región constante de

cadena pesada representada por el subrayado en las figuras 17B y 18B empieza en la posición 118 (en numeración EU). La posición también se puede referir por su posición en la numeración secuencial de los aminoácidos de la cadena ligera o cadena pesada de longitud completa en las figuras 17-18. Según una realización de la presente invención, un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína modificada en LC-V205C (número Kabat: Val 205; número secuencial 210 en la Figura 18A modificada para ser Cys en esa posición). La cisteína modificada en la cadena ligera se muestra en texto en negrita y doble subrayado en las figuras 18A. Según una realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína modificada en HC-A 118C (número EU: Ala 118; número Kabat 114; número secuencial 118 en la Figura 17B modificada para ser Cys en esa posición). La cisteína modificada en la cadena pesada se muestra en texto en negrita y doble subrayado en la figura 17B. Según una realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína modificada en Fc-S400C (número EU: Ser 400; número Kabat 396; número secuencial 400 en la figura 17-18B modificada para ser Cys en esa posición). En otras realizaciones, la cisteína modificada de la cadena pesada (incluyendo la región Fc) está en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración Kabat con la numeración EU entre paréntesis): 5, 23, 84, 112, 114 (118 en numeración EU), 116 (120 en numeración EU), 278 (282 en numeración EU), 371 (375 en numeración EU) o 396 (400 en numeración EU). De este modo, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b humanizado parental de la presente invención son: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C en numeración EU), T116C (T120C en numeración EU), V278C (V282C en numeración EU), S371C (S375C en numeración EU) o S396C (S400C en numeración EU). De este modo, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b quimérico parental de la presente invención son: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C en numeración EU), T116C (T120C en numeración EU), V278C (V282C en numeración EU), S371C (S375C en numeración EU) o S396C (S400C en numeración EU). De este modo, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b quimérico parental de la presente invención son: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C en numeración EU), T116C (T120C en numeración EU), V278C (V282C en numeración EU), S371C (S375C en numeración EU) o S396C (S400C en numeración EU). En otras realizaciones, la cisteína modificada de la cadena ligera está en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración Kabat): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. De este modo, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b humanizado parental de la presente invención son: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, o V205C. De este modo, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b quimérico parental de la presente invención son: I15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, o V205C.

[0257] También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres donde el anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas se une a un polipéptido CD79b y se prepara mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína donde el anticuerpo parental comprende por lo menos una secuencia de HVR seleccionada entre:

- (a) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, en la que A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 59);
- (b) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVSKLDS (SEQ ID NO: 60);
- (c) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es WQGTHFPYT (SEQ ID NO: 61) O FQGTHFPFT (SEQ ID NO: 79);
- (d) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 62);
- (e) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 63) y
- (f) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F10 es ARNLYL (SEQ ID NO: 64)

[0258] También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con un anticuerpo modificado con cisteínas que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, o una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo modificado con cisteínas que carece del péptido señal tal como se describe aquí;

[0259] También se describe en el presente documento un anticuerpo anti-CD79b aislado modificado con cisteínas que comprende una secuencia de aminoácidos que es codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo modificado con cisteínas que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, (b) una secuencia de aminoácidos de anticuerpo modificado con cisteínas que carece del péptido señal tal como se describe aquí, (c) un dominio extracelular de una proteína transmembrana de anticuerpo modificado con cisteína, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico tal como se describe aquí o (e) cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de aminoácidos de longitud completa de anticuerpo modificado con cisteínas tal como se describe aquí;

[0260] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b aislado modificado con cisteínas sin la secuencia señal N-terminal y/o sin la metionina de iniciación y es codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha una secuencia de aminoácidos tal como se describe aquí. Los procesos para producir los mismos también se describen aquí, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que

comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado con cisteínas y recuperar el anticuerpo modificado con cisteínas del cultivo celular;

5 **[0261]** Otro aspecto específico de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b aislado modificado con cisteínas, que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado. Los procesos para producir los mismos también se describen aquí, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo modificado con cisteínas y recuperar el anticuerpo modificado con cisteínas del cultivo celular;

10 **[0262]** En otros aspectos, la presente invención proporciona anticuerpos modificados con cisteína quiméricos anti-CD79b aislados que comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados con cisteína descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo (no CD79b). Ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los anticuerpos modificados con cisteína descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo tal como, por ejemplo, una secuencia de epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

15 **[0263]** El anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido CD79b a su epítipo antigénico respectivo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden opcionalmente conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, maitansinoide, un derivado de dolostatina o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o la proliferación de o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar para ser detectables, unirse a un soporte sólido o similares.

20 **[0264]** También se describen en el presente documento vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b y anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína aquí descritos. También se proporcionan células huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. Se proporciona además un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos aquí descritos y comprende cultivar células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

25 **[0265]** Los anticuerpos modificados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen anticuerpos específicos para receptores de superficie celular y transmembrana, y antígenos asociados a tumores (TAA). Dichos anticuerpos se pueden utilizar como anticuerpos desnudos (no conjugados a un fármaco o grupo marcador) o como conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC). Los anticuerpos modificados con cisteínas de la presente invención se pueden acoplar de manera específica de sitio y eficiente con un reactivo reactivo a tiol. El reactivo reactivo a tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo marcador de captura, un reactivo fluoróforo, o un intermedio enlazador a fármaco. El anticuerpo modificado con cisteína se puede marcar con un marcador detectable, inmovilizarse en un soporte en fase sólida y/o conjugarse con un grupo farmacológico. La reactividad de tiol se puede generalizar a cualquier anticuerpo donde la sustitución de aminoácidos por aminoácidos de cisteína reactivos se puede realizar en los intervalos en la cadena ligera seleccionados de los intervalos de aminoácidos: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; y en los intervalos en la cadena pesada seleccionados de los intervalos de aminoácidos: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, y en la región Fc en los intervalos seleccionados entre H270-H280, H366-H376, H391-401, donde la numeración de las posiciones de aminoácidos empieza en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa de manera secuencial a continuación tal como se describe en WO2006034488; US 2007/0092940. La reactividad de tiol también se puede generalizar a ciertos dominios de un anticuerpo, tal como el dominio constante de cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteínas que dan lugar a los valores de reactividad de tiol de 0,6 y superiores se pueden realizar en los dominios constantes de cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Dichos anticuerpos y sus usos se describen en WO2006/034488; US 2007/0092940.

30 **[0266]** Los anticuerpos modificados con cisteína de la presente invención mantienen preferiblemente la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpo parental de tipo salvaje. De este modo, los anticuerpos modificados con cisteína son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a antígeno. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas de señalización, factores reguladores de supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuye funcionalmente a) el desarrollo diferenciación del tejido, linfoquinas, citoquinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas

asociadas con (por ejemplo, se sabe o se sospecha que contribuye funcionalmente a) angiogénesis. El antígeno asociado a tumor puede ser un factor de diferenciación en clúster (es decir, una proteína CD, incluyendo, pero sin limitación, CD79b). Los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína de la presente invención mantienen la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpo anti-CD79b parental. De este modo, los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína de la presente invención son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a antígenos de CD79b, que incluyen isoformas beta y/o alfa anti-CD79b humanas, incluyendo cuando dichos antígenos se expresan en la superficie de células, incluyendo, sin limitación, células B.

[0267] En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar con cualquier grupo marcador que se pueda unir covalentemente al anticuerpo a través de un grupo reactivo, un grupo activado, o un grupo tiol de cisteína reactivo (Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). El grupo unido puede actuar para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcador, por ejemplo para proporcionar FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o incrementar la afinidad de unión, con antígeno o ligando; (iv) afectar a la movilidad, por ejemplo movilidad electroforética o permeabilidad celular, mediante la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar un grupo de captura, para modular la afinidad de ligando, unión anticuerpo/antígeno, o complejación iónica.

[0268] Los anticuerpos modificados con cisteína marcados pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o scrum específicos. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará normalmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar en general en las siguientes categorías:

[0269] Los radioisótopos (núcleos radioactivos), tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At , o ^{213}Bi . Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en experimentos de obtención de imágenes reconocidas de receptores. El anticuerpo se puede marcar con reactivos ligandos que se unen, forman quelatos o se complejan con un metal radioisótopo, donde el reactivo es reactivo con el tiol de cisteína diseñado del anticuerpo, utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que se pueden complejar con un ion metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los núcleos radioactivos se pueden marcar a través de la complejación con los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención (Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1137-1146).

[0270] Se pueden preparar reactivos enlazantes, tales como DOTA-maleimida (4-maleimidobuyiramidobencil-DOTA) mediante la reacción de aminobencil-DOTA con ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con isopropilcloroformiato (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy et al (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807). Los reactivos DOTA-maleimido reaccionan con los aminoácidos de cisteína libre de los anticuerpos modificados con cisteína y proporcionan un ligando complejante de metal sobre el anticuerpo (Lewis et al (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86). Reactivos marcadores enlazadores quelantes, tales como DOTA-NHS (mono (N-hidroxisuccinimida éster de ácido 1,4,7,10-tetraaracilododecano-1,4,7,10-tetraacético) están disponibles comercialmente (Macrocyclics, Dallas, TX). La obtención de imágenes de dianas receptoras con anticuerpos marcados con núcleos radioactivos pueden proporcionar un marcador de la activación del mecanismo mediante la detección y cuantificación de acumulación progresiva de anticuerpos en tejido tumoral (Albert et al (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer de forma intracelular después de la degradación lisosomal.

[0271] Se describen complejos de quelatos metálicos adecuados como marcadores de anticuerpos para experimentos de obtención de imágenes: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Minadeh et al (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; IZard et al (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo et al (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20: 65-74; Roselli et al (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

[0272] Los marcadores fluorescentes son tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), tipos de fluoresceína, incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; tipos de rodamina incluyendo TAMRA; dansilo; Lissamine; cianinas; ficoeritrinas; Texas Red; y análogos de los mismos. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar a anticuerpos utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. Los colorantes fluorescentes y reactivos de marcadores fluorescentes incluyen aquellos que están

disponibles comercialmente de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

[0273] Están disponibles o se describen varios marcadores enzima-sustrato (US 4275149). La enzima cataliza en general una alteración química de un sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado mediante una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; US 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidada, tal como peroxidada de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

[0274] Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRP) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrogeno peroxidada oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) fosfatsa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[0275] Numerosas combinaciones de otros enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la materia. Para una revisión general, véase US 4275149 y US 4318980.

[0276] Un marcador se puede conjugar indirectamente con una cadena lateral de aminoácido, una cadena lateral de aminoácido activada, un anticuerpo modificado con cisteínas, y similar. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se puede conjugar con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a estreptavidina y de este modo, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo de manera indirecta. Alternativamente, para conseguir una cojugación indirecta del marcador con la variante de polipéptido, la variante de polipéptido se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un polipéptido variante anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con el polipéptido variante (Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

[0277] El anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual de Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

[0278] Un marcador detectable puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar una unión o un reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la presente invención pueden detectar receptores de la superficie celular. Otro uso para los anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en partículas que comprende conjugar una partícula con un anticuerpo marcado fluorescente y detectar la señal de fluorescencia tras la unión de un ligando. Metodologías de detección de unión similares utilizan el efecto de la resonancia de plasmones de superficie (SPR) para medir y detectar las interacciones anticuerpo-antígeno.

[0279] Los marcadores de detección, tales como colorantes fluorescentes y colorantes quimioluminiscentes (Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc. Perkin-Trans. 1:1051-1058*) proporcionan una señal detectable y en general son aplicables para marcar anticuerpos, preferiblemente con las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal muy elevada con ruido de fondo bajo, de manera que se pueden detectar de manera sensible pequeñas cantidades de anticuerpos en ensayos libres de células y de base celular; y (ii) el anticuerpo marcado debe ser fotoestable, de manera que se pueda observar, monitorizar y registrar la señal fluorescente sin un fotoblanqueo significativo. Para aplicaciones que implican la unión en la superficie celular de anticuerpo marcado a membranas o superficies celulares, especialmente células vivas, los marcadores preferiblemente (iii) tienen una buena solubilidad en agua para conseguir una concentración eficaz de conjugado y una sensibilidad de la detección y (iv) son no tóxicos para las células vivas para no alterar los procesos metabólicos normales de las células o causan la muerte prematura celular.

[0280] La cuantificación directa de la intensidad de la fluorescencia celular y la enumeración de elementos marcados

de forma fluorescente, por ejemplo, la unión a la superficie celular de conjugados de péptido-colorante se puede realizar en un sistema (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza ensayos no radioactivos de mezcla y lectura con células vivas o partículas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. de Biomolecular Screening* 4:193-204). Los usos de anticuerpos marcados también incluyen ensayos de unión a receptores de la superficie celular, ensayos de inmunocaptura, ensayos inmunoabsorbentes unidos a fluorescencia (FLISA), separación con caspasa (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; US 6372907), apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) y ensayos citotóxicos. La tecnología de ensayos con microvolúmenes fluorométricos se puede utilizar para identificar la regulación por aumento o disminución por una molécula que está dirigida a la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

[0281] Los anticuerpos marcados de la presente invención son útiles como biomarcadores de imagen y sondas mediante los diversos métodos y técnicas de obtención de imágenes biomédica y molecular, tales como (i) MRI (obtención de imágenes por resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computerizada); (iii) SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía de emisión de positrón) Chen et al (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminescencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonidos. La inmunoescintografía es un procedimiento de obtención de imágenes en que los anticuerpos marcados con sustancias radioactivas se administran a un animal o paciente humano y se obtiene una fotografía de sitios en el cuerpo donde se localiza el anticuerpo (US 6528624). Los biomarcadores para la obtención de imágenes se pueden medir y evaluar de manera objetiva como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: tipo 0 son marcadores de historia natural de una enfermedad y se correlacionan longitudinalmente con indicios clínicos conocidos, por ejemplo, valoración por MRI de la inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores Tipo I capturan el efecto de una intervención según un mecanismo de acción, aunque el mecanismo puede no estar asociado con el resultado clínico; los marcadores Tipo II funcionan como puntos finales sucedáneos donde el cambio o la señal del biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta reconocida, tal como una erosión ósea medida en artritis reumatoide mediante CT. Los biomarcadores para obtener imágenes pueden proporcionar de este modo información terapéutica farmacodinámica (PD) sobre: (i) expresión de una proteína diana, (ii) unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir selectivamente, y (iii) datos de aclarado y datos farmacocinéticos de vida media. Las ventajas de los biomarcadores para obtener imágenes in vivo en relación a biomarcadores de base laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificable, valoración de todo el cuerpo, dosificación y valoración repetitiva, es decir, puntos de tiempo múltiples y efectos potencialmente transferibles a partir de resultados preclínicos (animales pequeños) a clínicos (humanos). Para algunas aplicaciones, las bioimágenes suplantando o minimizan el número de experimentos con animales en estudios preclínicos.

[0282] Los métodos de marcaje de péptidos son bien conocidos. Véase, Haugland. 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Carman. (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification. Vols. I and II*, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins". *Modern Methods in Protein Chemistry*. H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem.Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

[0283] Los péptidos y proteínas marcados con dos grupos, un informador fluorescente y desactivados con una proximidad suficiente experimentan una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los grupos informadores son habitualmente colorantes fluorescentes que son excitados por una luz a una cierta longitud de onda y transfieren la energía a un grupo aceptor, o desactivante, con el desplazamiento de Stokes apropiado para la emisión a brillo máximo. Los colorantes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad extendida, tales como fluoresceína y rodamina, y sus derivados. El informador fluorescente se puede desactivar parcial o significativamente por el grupo desactivador en un péptido intacto. Tras la separación del péptido por una peptidasa o proteasa, se puede medir un incremento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

[0284] Los anticuerpos marcados de la presente invención también se pueden utilizar como un agente de purificación de afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza en una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar, y a continuación, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, a excepción del antígeno a purificar, que

está unido al polipéptido variante inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno del polipéptido variante.

[0285] Los reactivos marcadores portarán habitualmente una funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de un anticuerpo modificado con cisteína para formar el anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un intermedio marcador-enlazador o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar el anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de reactivos marcadores incluyen: maleimida, haloacetilo, succinimidil éster de yodoacetamida (por ejemplo NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6-diclorotriazinilo, éster de pentafluorofenilo, y fosforamidita, aunque también se pueden utilizar otros grupos funcionales.

[0286] Un grupo funcional reactivo de ejemplo es éster N-hidroxisuccinimidilo (NHS) de un grupo carboxilo sustituyente de un marcador detectable, por ejemplo biotina o un colorante fluorescente. El éster NHS del marcador se puede preformar, aislar, purificar, y/o caracterizar o se puede formar in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Habitualmente, la forma carboxilo del marcador se activa mediante la reacción con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, por ejemplo dicitclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, por ejemplo TSTU tetrafluoroborato de (O-(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HBTU (hexafluorofosfato de (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), un activador, tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), y N-hidroxisuccinimida para producir el éster NHS del marcador. En algunos casos, el marcador y el anticuerpo se pueden acoplar mediante activación in situ del marcador y la reacción con el anticuerpo para formar el conjugado de marcador-anticuerpo en una etapa. Otros reactivos activantes y acoplantes incluyen TBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazo-1-il)-1-1,3,3-tetrametiluronio), TFFH (2-fluoro-hexafluorofosfato de N,N,N',N''-tetrametiluronio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio, EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), DCC (dicitclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitilen-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo, y haluros de aril sulfonilo, por ejemplo cloruro de triisopropilbencenosulfonilo.

Compuestos de péptido de unión a albúmina-Fab de la presente invención:

[0287] En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención se fusiona a una proteína de unión a albúmina. La unión a proteína de plasma puede ser un medio opcional de mejorar las propiedades farmacocinéticas de moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína más abundante del plasma. Los péptidos de unión a albúmina de suero (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de proteínas de dominio activo fusionadas, incluyendo la alteración de la captación, penetración y difusión en el tejido. Estos parámetros farmacodinámicos se pueden modular mediante la selección específica de la secuencia de péptido de unión a albúmina de suero apropiada (US 20040001827). Se identificaron una serie de péptidos de unión a albúmina mediante cribado por expresión en fagos (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics de Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Los compuestos de la presente invención incluyen secuencia ABP mostradas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) US 20040001827 en [0076] SEQ ID NOS: 9-22; y (iii) WO 01/45746 en las páginas 12-13, todas ellas incorporadas en la presente por referencia. Los Fabs de unión a albúmina (ABP) se diseñan mediante la fusión de un péptido de unión a albúmina con el extremo c-terminal de la cadena pesada de Fab en la proporción estequiométrica 1:1o (1 ABP / 1 Fab). Se observó que la asociación de estos ABP-Fabs con albúmina incrementaba la vida media del anticuerpo en más de 25 veces en conejos y ratones. Los residuos de cys reactivos antes descritos pueden por tanto introducirse en estos ABP-Fabs y utilizarse para la conjugación específica de sitio con fármacos citotóxicos seguidos de estudios animales in vivo.

[0288] Las secuencias de péptidos de unión a albúmina de ejemplo incluyen, pero sin limitación, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NOS: 80-84:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 80
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 81
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 82
RLIEDICLPRWGGLWEDD	SEQ ID NO: 83
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO: 84

Conjugados de anticuerpo y fármaco

[0289] En otro aspecto, la presente invención proporciona inmunoconjugados, o conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), que comprende un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la presente invención proporciona además métodos de utilización de los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b anteriores unidos covalentemente a un agente citotóxico o un agente detectable.

5 **[0290]** En un aspecto, un anticuerpo CD79b de la presente invención se une al mismo epítipo en CD79b unido por otro anticuerpo CD79b. En otra realización, un anticuerpo CD79b de la presente invención se une al mismo epítipo en CD79b unido por el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio de 1993, comprendiendo el anticuerpo monoclonal los dominios variables de SEQ ID NO: 10 (Figuras 7A-B) y SEQ ID NO: 14 (Figuras 8A-B) o comprendiendo el anticuerpo quimérico el dominio variable de anticuerpo generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio 1993 y los dominios constantes de IgG1, o comprendiendo los dominios variables de anticuerpo monoclonal las secuencias de SEQ ID NO: 10 (Figuras 7A-B) y SEQ ID NO: 14 (Figuras 8A-B). En otra realización, un anticuerpo CD79b de la presente invención se une al mismo epítipo en CD79b unido por otro anticuerpo CD79b (es decir, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Scrotcc Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Scrotcc Catalog #MC2209), anticuerpos anti-CD79b humano (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

15 **[0291]** En otro aspecto, un anticuerpo CD79b de la presente invención es distinto de (es decir, no es) un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio de 1993, comprendiendo el anticuerpo monoclonal los dominios variables de SEQ ID NO: 10 (Figuras 7A-B) y SEQ ID NO: 14 (Figuras 8A-B) o comprendiendo el anticuerpo quimérico el dominio variable de anticuerpo generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio 1993 y los dominios constantes de IgG1, o comprendiendo los dominios variables de anticuerpo monoclonal las secuencias de SEQ ID NO: 10 (Figuras 7A-B) y SEQ ID NO: 14 (Figuras 8A-B). En otra realización, un anticuerpo CD79b de la presente invención es distinto de (es decir, no es) un fragmento Fab de otro anticuerpo GD79b ((es decir, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anticuerpo anti-CD79b humano (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

25 **[0292]** En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a CD79b de una primera especie animal, y no se une específicamente a CD79b de una segunda especie animal. En una realización, la primera especie animal es humana y/o primate (por ejemplo, mono cynomolgus), y la segunda especie animal es murina (por ejemplo, ratón) y/o canino. En una realización, la primera especie animal es humana. En una realización, la primera especie animal es primate, por ejemplo mono cynomolgus. En una realización, la segunda especie animal es murina, por ejemplo ratón. En una realización, el segundo animal es canino.

[0293] En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención y un portador. En una realización, el portador es farmacéuticamente aceptable.

35 **[0294]** La solicitud también describe ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo CD79b de la presente invención.

[0295] La solicitud también describe vectores que comprenden un ácido nucleico de la presente invención.

40 **[0296]** La solicitud también describe células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la presente invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de células huésped. En una realización, una célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, E. coli. En una realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo una célula de mamífero, tal como célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

45 **[0297]** En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo CD79b (que, tal como se define aquí incluye longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la presente invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo.

50 **[0298]** En el presente documento se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, donde la composición comprende uno o más anticuerpos CD79b de la presente invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico descrito aquí. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un portador, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

55 **[0299]** En el presente documento también se describe un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos CD79b de la presente invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo antagonista comprende además un portador, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

60 **[0300]** En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo CD79b de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un

cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

5 **[0301]** También se describe el uso de ácido nucleico aquí descrito en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario,
10 NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

15 **[0302]** el uso de un vector de expresión aquí descrito en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

20 **[0303]** el uso de una célula huésped aquí descrita en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL),
25 leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

30 **[0304]** el uso de un artículo de fabricación aquí descrito en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

35 **[0305]** el uso de un kit aquí descrito en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se seleccionan entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

40 **[0306]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro de inhibición del crecimiento de una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la presente invención, causando así la inhibición del crecimiento de dicha célula. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento. En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la invención para utilizar en un método de tratamiento de un mamífero que comprende inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD79b, en el que dicha célula es una célula tumoral.

50 **[0307]** En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para utilizar en un método de tratamiento terapéutico de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando así de manera eficaz dicho mamífero. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

55 **[0308]** En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para utilizar en un método for tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con una expresión incrementada de CD79b, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando o previniendo así de manera eficaz dicho trastorno proliferativo celular. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

60 **[0309]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro para inhibir el crecimiento de una célula, donde el crecimiento de dicha célula es por lo menos en parte dependiente del efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En una realización, el anticuerpo está conjugado a

65

un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0310] En un aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la presente invención para utilizar en un método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor es por lo menos en parte dependiente del efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, tratando así de manera eficaz dicho tumor. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0311] En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para utilizar en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente la formulación farmacéutica que comprende un inmunocombinado aquí descrito; diluyente, portador o excipiente aceptable. En una realización, el cáncer se selecciona entre el linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de célula de manto. En una realización, el paciente es administrado con un agente citotóxico en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco.

[0312] En un aspecto, la presente invención proporciona un método in vitro de inhibición de la proliferación de células B que comprende exponer una célula a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones permisivas para la unión del inmunocombinado a CD79b. En una realización, la proliferación de células B se selecciona entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de célula de manto. En una realización, la célula B es un xenoinjerto. En una realización, la exposición tiene lugar in vitro. En una realización, la exposición tiene lugar in vivo.

[0313] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de determinación de la presencia de CD79b en una muestra sospechosa de contener CD79b, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo de la presente invención, y determinar la unión de dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra donde la unión de dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra. En una realización, la muestra es una muestra biológica. En una realización adicional, la muestra biológica comprende células B. En una realización, la muestra biológica es de un mamífero que experimenta o es sospechoso de experimentar un trastorno de células B y/o un trastorno proliferativo de células B que incluye, pero sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de célula de manto

[0314] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de trastorno proliferativo celular asociado con un incremento en las células, tal como células B, que expresa CD79b, comprendiendo el método poner en contacto una célula de análisis en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a las células de análisis en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD79b; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra de control, donde el nivel de anticuerpo unido se normaliza al número de células que expresan CD79b en las muestras de análisis y control, y donde un nivel superior de anticuerpo unido en la muestra de análisis en comparación con la muestra de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan CD79b.

[0315] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de CD79b soluble en sangre y suero, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de análisis de sangre o suero de un mamífero sospechoso de experimentar un trastorno proliferativo de células B con un anticuerpo anti-CD79b de la presente invención y detectar un incremento en CD79b soluble en la muestra de análisis en relación con una muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En una realización, el método de detección es útil como un método de diagnóstico de un trastorno proliferativo de células B asociado con un incremento en CD79b soluble en sangre o suero de un mamífero.

[0316] También se describe un método de unión de un anticuerpo de la presente invención a una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la presente invención. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En una realización, el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

[0317] Los anticuerpos e inmunocombinados de la presente invención se pueden utilizar para afectar a cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con la expresión de CD79b. En una realización, una célula que es reconocida es una célula hematopoyética. Por ejemplo, una célula hematopoyética se puede seleccionar del grupo que consiste en un linfocito, leucocito, plaqueta, eritrocito y célula asesina natural. En una realización, una célula que es reconocida es una célula B o una célula T. En una realización, una célula que es reconocida es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que

consiste en una célula de linfoma, célula de leucemia o célula de mieloma.

[0318] Los métodos pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa donde una célula y/o tejido reconocidos (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a un tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

[0319] Tal como se describe aquí, CD79b es un componente de señalización del receptor de célula B. Por consiguiente, en una realización, una célula que es reconocida (por ejemplo, una célula cancerosa) es aquella en que se expresa CD79b en comparación con una célula que no expresa CD79b. En una realización adicional, la célula reconocida es una célula cancerosa en que la expresión de CD79b está aumentada en comparación con una célula no cancerosa normal del mismo tipo de tejido. En una realización, el tratamiento provoca la muerte de una célula reconocida.

[0320] Se describen también en el presente documento vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos aquí descritos. También se proporciona la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de E. Coli o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos aquí descritos y comprende cultivar células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

[0321] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo anti-CD79b tal como se describe aquí, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

[0322] Otro aspecto de la presente invención está dirigido al uso de un anticuerpo anti-polipéptido CD79b tal como se describe aquí, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una patología que es sensible al anticuerpo anti-polipéptido CD79b.

[0323] Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende una mezcla de compuestos de anticuerpo-fármaco de fórmula I, donde la carga de fármaco promedio por anticuerpo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

[0324] Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que incluye un compuesto ADC de fórmula I, una mezcla de compuestos ADC de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0325] Otro aspecto proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto ADC de Fórmula I y un segundo compuesto que tiene propiedades anticancerosas u otros efectos terapéuticos.

[0326] Otro aspecto es un inmunoc conjugado para utilizar en un método para eliminar o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas que comprende tratar las células con una cantidad de un conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, que es efectivo para eliminar o inhibir la proliferación de las células tumorales o células cancerosas.

[0327] Otro aspecto es una composición para utilizar en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye ADC de Fórmula I.

[0328] Se describen además artículos de fabricación, es decir kits, que comprenden un conjugado de anticuerpo y fármaco, un recipiente, y un prospecto o marcador que indican un tratamiento.

[0329] También se describe un método para fabricar un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I que comprende las etapas de: (a) hacer reaccionar un grupo cisteína diseñado del anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo enlazador para formar un intermedio enlazador de anticuerpo Ab-L; y (b) hacer reaccionar Ab-L con un grupo farmacológico activado D; mediante lo cual se forma el conjugado anticuerpo-fármaco, o que comprende las etapas de: (c) hacer reaccionar un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador para formar un intermedio enlazador de fármaco D-L; y (d) hacer reaccionar D-L con un grupo cisteína diseñado del anticuerpo modificado con cisteínas; a través de lo cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco.

[0330] Un aspecto de la presente invención es un ensayo para detectar células cancerosas que comprende: (a) exponer células a un conjugado de anticuerpo anti-Cd79b modificado con cisteínas y fármaco; y (b) determinar el grado de unión del compuesto conjugado de anticuerpo anti-Cd79b modificado con cisteínas y fármaco a las células.

A. Anticuerpos anti-CD79b

[0331] La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[0332] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

[0333] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se analiza por el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se utilizan de forma adecuada agentes de agregación, tales como el alumbre, para potenciar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

[0334] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0335] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan a continuación con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

[0336] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también referidas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0337] Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio selectivo que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Entre las líneas de células de mieloma preferidas están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 y derivadas, por ejemplo, células X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0338] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0339] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0340] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103

(Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en los ratones.

5 **[0341]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

10 **[0342]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. Coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plüchthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

20 **[0343]** En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

30 **[0344]** El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L) humanos por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

40 3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0345] Los anticuerpos anti-CD79b de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332 : 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

60 **[0346]** Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la

sustitución de secuencias de CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0347] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando el anticuerpo pretende utilizarse para uso terapéutico humano. La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Véanse, por ejemplo, Khazzacli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332: 323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495. Tal como se describe aquí, la invención proporciona anticuerpos que están humanizados, de manera que la respuesta HAMA se reduce o se elimina. Las variantes de estos anticuerpos se pueden obtener además utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación. Según el método denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. Se identifica el dominio V humano de la secuencia humana que está más próxima a la del roedor y se acepta la región de armazón (FR) humana en el mismo para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región de armazón particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0348] Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo tal como se describe aquí puede actuar como secuencia de partida (parental) para la diversificación de las secuencia o secuencias del armazón y/o hipervariable. A la secuencia de armazón seleccionada a la que se une la secuencia hipervariable de partida se hace referencia aquí como un armazón humano aceptor. Aunque los armazones humanos aceptores pueden ser, o derivan de, una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de la misma), preferiblemente los armazones humanos aceptores son de, o derivan de, un armazón consenso humano como tal, los armazones han demostrado tener una inmunogenicidad mínima o nula en pacientes humanos.

[0349] Cuando el aceptor deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia de armazón humana que se selecciona en base a su homología con la secuencia del armazón dadora mediante la alineación de la secuencia del armazón dadora con varias secuencias de armazón humanas en un conjunto de secuencias de armazón humanas y la selección de la secuencia de armazón más homóloga.

[0350] En una realización, los armazones consenso humanos de la presente invención son de, o derivan de, las secuencias de armazón consenso del subgrupo III de VH y/o el subgrupo I kappa de VL.

[0351] De este modo, el armazón humano aceptor de VH puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de armazón siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 69)

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 70),

FR3 que comprende RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNLSRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 73), donde X₁ es A o R, X₂ es T o N, y X₃ es A o L,

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72).

[0352] Entre los ejemplos de armazones consenso de VH se incluyen:

Armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 36);

armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 37-39);

armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 40);

armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos regiones hipervariables menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 41-43);

armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 44);

armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos regiones hipervariables menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 45-47);

armazón aceptor de VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID No. 48),

armazón aceptor de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID Nos. 49-50);

armazón del aceptor 2 de VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 51); o

armazón del aceptor 2 de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 52-54).

[0353] En una realización, el armazón humano aceptor de VH comprende una, dos, tres o todas de las secuencias de armazón siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSGAAS (SEQ ID NO: 69),
 FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 70),
 FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 71),
 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 74),
 5 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 75),
 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 76), or
 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 77)
 FR4 que comprende WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 72).

10 **[0354]** El armazón humano aceptor de VL puede comprender una, dos, tres o todas de las secuencias de armazón siguientes:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 65),
 FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 66),
 FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 67),
 15 FR4 que comprende FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 68).

[0355] Entre los ejemplos de armazones consenso de VL se incluyen:

Armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano (SEQ ID No. 55);
 Armazón consenso del subgrupo II kappa de VL humano (SEQ ID No. 56);
 20 Armazón consenso del subgrupo III kappa de VL humano (SEQ ID No. 57); o
 Armazón consenso del subgrupo IV kappa de VL humano (SEQ ID No. 58).

25 **[0356]** Aunque el aceptor puede ser idéntico en la secuencia a la secuencia de armazón humana seleccionada, tanto si es de una inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano, la presente invención contempla que la secuencia aceptor pueda comprender sustituciones de aminoácido existentes en relación con la secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia del armazón consenso humano. Estas sustituciones preexistentes son preferiblemente mínimas; normalmente cuatro, tres, dos o una diferencia de aminoácidos sólo en relación con la secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia del armazón consenso.

30 **[0357]** Los residuos de la región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan en los armazones humanos aceptores de VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos CDR Kabat, los residuos de bucle hipervariable Chothia, los residuos Abms, y/o residuos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los siguientes residuos de la región hipervariable extendida: 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3).

35 **[0358]** Aunque aquí se describe la "incorporación" de residuos de la región hipervariable, se entenderá que esto se puede conseguir de varias maneras, por ejemplo, se pueden generar ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada mediante la mutación de ácidos nucleicos que codifican la secuencia del dominio variable de ratón, de manera que los residuos del armazón de la misma se cambian a residuos del armazón humano aceptor, o mediante la mutación de ácidos nucleicos que codifican la secuencia del dominio variable humano, de manera que los residuos del dominio hipervariable se cambian a residuos no humanos, o mediante la síntesis de ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

40 **[0359]** En los ejemplos de la presente invención, se generaron variantes injertadas en la región hipervariable mediante mutagénesis Kunkel de ácido nucleico que codifica las secuencias aceptoras humanas utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Se pueden introducir cambios apropiados en el armazón y/o la región hipervariable utilizando técnicas de rutina para corregir y reestablar las interacciones región hipervariable-antígeno correctas.

45 **[0360]** La expresión en fagémidos (también referido aquí como expresión en fagos en algunos contextos) se puede utilizar como un método conveniente y rápido para generar y cribar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada mediante obtención aleatoria de secuencias. Sin embargo, existen otros métodos para el experto en la materia para fabricar y cribar anticuerpos alterados.

50 **[0361]** La tecnología de expresión en fagémidos ha proporcionado una herramienta potente para generar y seleccionar proteínas nuevas que se unen a un ligando, tales como antígeno. Utilizando las técnicas de expresión en fagémidos se permite la generación de bibliotecas grandes de variantes de proteínas que se pueden clasificar rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con una afinidad elevada. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan en general a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de envoltura viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de expresión en fagémicos monovalentes donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de expresión en fagémicos monovalentes, la fusión génica se expresa a niveles bajos y también se expresan las proteínas del gen III de tipo salvaje, de manera que se mantiene la infectividad de las partículas. Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y el cribado de estas bibliotecas se han descrito en muchas

patentes (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,723,286, Patente de Estados Unidos. 5,432, 018, Patente de Estados Unidos. 5,580,717, Patente de Estados Unidos No. 5,427,908 y Patente de Estados Unidos No. 5,498,530).

5 **[0362]** Las bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno se han preparado de una serie de manera que incluyen la alteración de un único gen mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o mediante la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos para expresar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno utilizando la expresión en fagémicos se han descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, y 5,658,727. La biblioteca se criba a continuación por la expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.

10 **[0363]** Los métodos de sustitución de un aminoácido de elección en un ácido nucleico de molde están bien establecidos en la técnica, algunos de los cuales se describen aquí. Por ejemplo, los residuos de la región hipervariable se pueden sustituir utilizando el método Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987).

15 **[0364]** La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los grupos de codones designados para los residuos de región hipervariable a alterar. El grupo de codones es un grupo de secuencias de tres nucleótidos diferentes utilizado para codificar aminoácidos variantes deseados. Los grupos de codones se pueden representar utilizando símbolos para designar nucleótidos concretos o mezclas equimolares de nucleótidos tal como se muestra a continuación según el código IUB.

CÓDIGOS IUB

25 **[0365]**
 G Guanina
 A Adenina
 T Timina
 C Citosina
 30 R (A o G)
 Y (C o T)
 M (A o C)
 K (G o T)
 S (C o G)
 35 W (A o T)
 H (A o C o T)
 B (C o G o T)
 V (A o C o G)
 D (A o G o T)H
 40 N (A o C G o T)

[0366] Por ejemplo, en el codón DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este grupo de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, y Cys.

45 **[0367]** Los grupos de oligonucleótidos o sondas se pueden sintetizar utilizando métodos estándar. Se puede sintetizar un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el grupo de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con “degeneración” de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones es conocida en la técnica. Dichos grupos de nucleótidos que tienen grupos de codones se pueden sintetizar utilizando sintetizados de ácidos nucleicos comerciales (disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un grupo de oligonucleótidos sintetizados que tienen un grupo de codones particulares incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferencias establecidas por el grupo de codones en la secuencia general. Los oligonucleótidos, tal como se utilizan en la presente invención, presentan secuencias que permiten la hibridación a un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios para enzimas de restricción para fines de clonación.

60 **[0368]** En un método, las secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos variantes se pueden crear mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido. Esta técnica es bien conocida en el sector tal como se describe en Zoller et al. Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987). Brevemente, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos variantes se crean mediante hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los grupos de codones deseados a una ADN molde, donde el molde es la forma en cadena sencilla del plásmido que contiene una secuencia del ácido nucleico molde de la región variable. Después de la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria entera del molde que incorporará de este modo el cebador de oligonucleótidos y contendrá los grupos de codones proporcionados por el grupo de oligonucleótidos.

- 5 **[0369]** En general, se utilizan oligonucleótidos de por lo menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al molde en cualquier cara del nucleótidos o nucleótidos que codifican para la mutación o mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido se hibridará correctamente a la molécula del ADN molde de cadena única. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas conocidas en el sector, tales como las descritas por Crea et al., Pro. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978).
- 10 **[0370]** El molde de ADN es generado por aquellos vectores que derivan de los vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles comercialmente son adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de replicación del fago de cadena única tal como se describe por Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). De este modo, el ADN a mutar se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar un molde de cadena única. La producción del molde de cadena única se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., anterior.
- 15 **[0371]** Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibrida al molde de cadena única en condiciones de hibridación adecuadas. A continuación, se añade una enzima polimerizante de ADN, normalmente ADN polimerasa de T7 o el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la hebra complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. De este modo, se forma una molécula de cadena doble heteróloga, de modo que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y la otra cadena (el modelo original) codifica la secuencia nativa inalterada del gen 1. Esta molécula de cadena doble heteróloga se transforma a continuación en una célula huésped adecuada, normalmente una procarionta, tal como E. coli JM101. Después del crecimiento de las células, se emplazan sobre placas de agarosa y se criban utilizando el cebador de oligonucleótidos radiomarcado con fosfato-32 para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.
- 20 **[0372]** El método descrito inmediatamente antes se puede modificar, de manera que se crea una molécula de cadena doble homóloga, en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de cadena única se hibrida al molde de cadena única tal como se describe anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxiribonucleótidos, desoxiriboadenosina (dATP), desoxiriboguanosina (dGTP), y desoxiribotimidina (dTTP), con una tiodesoxiribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde a excepción de las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión con endonucleasas de restricción. Después de cortar la hebra del molde de la doble cadena heteróloga con una enzima de restricción apropiada, la hebra del molde se puede digerir con la ExoIII nucleasa u otra nucleasa apropiada después de la región que contiene el sitio o sitios a mutagenizar. A continuación, se detiene la reacción para dejar una molécula que sólo tiene parcialmente una única cadena. A continuación, se forma una doble cadena homóloga de ADN utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de doble cadena homóloga se pueden entonces transferir a una célula huésped adecuada.
- 25 **[0373]** Tal como se ha indicado previamente, la secuencia del grupo de oligonucleótidos es suficientemente larga para hibridarse al ácido nucleico molde y puede contener, pero no necesariamente, sitios de restricción. El molde de ADN se puede generar mediante estos vectores que derivan de vectores del bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago de cadena única tal como se describe por Viera et al. Meth. Enzymol., 153:3 (1987). De este modo, el ADN a mutar debe insertarse en uno de estos vectores con el fin de generar un molde de cadena única. La producción del molde de cadena única se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., supra.
- 30 **[0374]** Según otro método, la unión a antígeno se puede restaurar durante la humanización de anticuerpos a través de la selección de regiones hipervariables reparadas (véase la solicitud No. No. 11/061,841, solicitada el 18 de febrero de 2005). El método incluye incorporar regiones hipervariables no humanas en un armazón aceptor e introducir además uno o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables sin modificar la secuencia del armazón aceptor. Alternativamente, la introducción de uno o más sustituciones de aminoácidos puede estar acompañada por las modificaciones en la secuencia de armazón aceptor.
- 35 **[0375]** Según otro método, se puede generar una biblioteca disponiendo de grupos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', cada grupo teniendo una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las secuencias diferentes establecidas por los grupos de codones en la secuencia de los oligonucleótidos. Los grupos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', junto con una secuencia del ácido nucleico de molde del dominio variable, se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos PCR. A los productos de PCR se les puede hacer referencia como "cassettes de ácidos nucleicos", ya que se pueden fusionar con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de envoltura viral y dominios de dimerización, utilizando técnicas de biología molecular establecidas.
- 40 **[0376]** La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los grupos de codones designados para las posiciones accesibles al disolvente y altamente diversas en la región hipervariable. Tal como se ha descrito
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

anteriormente, un grupo de codones es un grupo de secuencias de tres nucleótidos diferentes utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados.

5 [0377] Se pueden aislar selectores de anticuerpos que cumplen con los criterios deseados, seleccionados a través de las etapas de cribado/selección apropiadas y clonarse utilizando técnicas recombinantes estándar.

10 [0378] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

20 [0379] Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-CD79b humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoc conjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

25 [0380] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de inmunoglobulina endógena en la producción. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852.

35 [0381] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., Nature 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

50 [0382] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

60 [0383] En ciertas circunstancias, existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

65 [0384] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal de Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)).

Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. Coli*, permitiendo así la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una mayor vida media in vivo que comprenden residuos de epítopo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0385] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de una proteína CD79b tal como se describe aquí. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a CD79b con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti- CD79b puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa CD79b. Estos anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CD79b. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD79b y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0386] WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de Estados Unidos 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα. La Patente de Estados Unidos No. 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0387] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0388] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadenas deseadas.

[0389] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en

el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0390] Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_{H3}. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0391] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0392] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0393] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. Coli.*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. Coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

[0394] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0395] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0396] Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados

Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360: WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter.

5 Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

10 **[0397]** Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente

15 puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente invención comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)n-

20 VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además,

30 comprenden un dominio CL.

8. Diseño de la función efectora

35 **[0398]** Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede

40 mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis por complemento y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión al receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por

50 ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunoconjugados

55 **[0399]** La presente invención también se refiere a inmunoconjugados (referidos indistintamente como "conjugados de anticuerpo y fármaco" o "ADC") que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

60 **[0400]** En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de

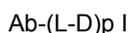
65

momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0401] También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, péptidos de auristatina, tales como onometilauristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maitansinoides, tales como DM1, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Inmunoconjugados de ejemplo – conjugados de anticuerpo y fármaco

[0402] Un inmunoconjugado (o "conjugado anticuerpo-fármaco" ("ADC")) de la invención puede ser de fórmula I siguiente, en la que un anticuerpo está conjugado (es decir unido covalentemente) a uno o más grupos farmacológicos (D) a través de un enlazador opcional (L). Los ADC pueden incluir conjugados de tíoMab y fármaco ("TDC")



[0403] Por consiguiente, el anticuerpo se puede conjugar al fármaco directamente o a través de un enlazador. En la fórmula I, p es el número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo, que puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos farmacológicos por anticuerpo, y en ciertas realizaciones, desde 1 a aproximadamente 8 grupos farmacológicos por anticuerpo. La presente invención incluye una composición que comprende una mezcla de compuestos anticuerpo-fármaco de fórmula I donde la carga promedio de fármaco por anticuerpo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

a) Enlazadores de ejemplo

[0404] Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Entre los ejemplos de componentes enlazadores se incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo (un "PAB"), y los resultantes de la conjugación con reactivos enlazadores: N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC", también referido aquí como "MCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). En la técnica se conocen varios componentes enlazadores, algunos de los cuales se describen a continuación.

[0405] Un enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.* *Cancer Research* 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

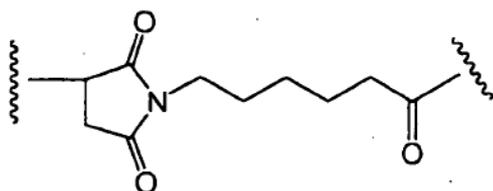
[0406] En ciertas realizaciones, un enlazador es tal como se muestra en la siguiente Fórmula II:



donde A es una unidad de extensión y a es un número entero de 0 a 1; W es una unidad de aminoácido, y w es un número entero de 0 a 12; Y es una unidad espaciadora, e y es 0, 1, ó 2; y A, D, y p son tal como se definen anteriormente para la Fórmula I. Realizaciones de ejemplo de dichos enlazadores se describen en US 2005-0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

[0407] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una "unidad de extensión" que une un anticuerpo a otro componente enlazador o a un grupo farmacológico. Las unidades de extensión de ejemplo se muestran a continuación (donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo):

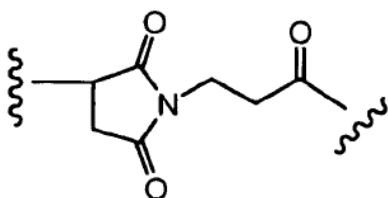
5



MC

10

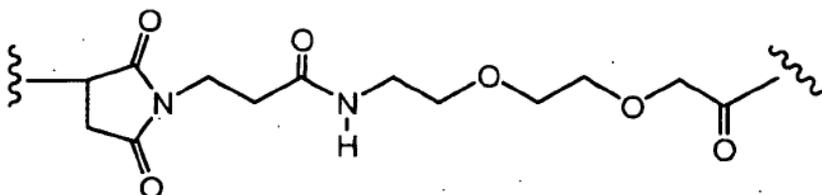
15



MP

20

25

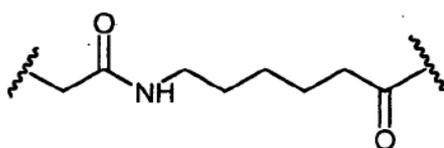


MPEG

30

35

40



45

[0408] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad de aminoácidos. En una de dichas realizaciones, la unidad de aminoácidos permite la división del enlazador por una proteasa, facilitando de este modo la liberación del fármaco del inmunocombinado tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas. Véase, por ejemplo, Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784. Entre las unidades de aminoácidos de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido y un pentapéptido. Entre los dipéptidos de ejemplo se incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o alaph); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); o N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Entre los tripéptidos de ejemplo se incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender residuos de aminoácidos naturales, así como aminoácidos secundarios y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Las unidades de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

50

55

60

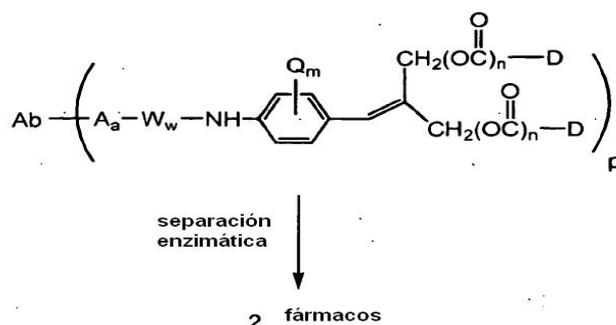
[0409] En algunas realizaciones, un componente enlazador puede comprender una unidad "espaciadora" que une el anticuerpo a un grupo farmacológico, directamente o mediante una unidad de extensión y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser "autoinmolutiva" o "no autoinmolutiva". Una unidad espaciador "no autoinmolutiva" es aquella en que parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al grupo farmacológico tras la división enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Entre los ejemplos de unidades no autoinmolutivas se incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. También se contemplan otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de división enzimática específica de

65

secuencia. Por ejemplo, la división enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a tumor daría lugar a la liberación de glicina-glicina-grupo farmacológico del resto del ADC. En una de dichas realizaciones, la glicina-glicina-grupo farmacológico se somete a continuación a una etapa de hidrólisis separada en la célula tumoral, separando así la unidad espaciadora de glicina-glicina del grupo farmacológico.

[0410] Una unidad espaciadora "autoinmolativa" permite la liberación del grupo farmacológico sin una etapa de hidrólisis separada. En ciertas realizaciones, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad de p-amino bencilo. En una de dichas realizaciones se une un p-aminobencil alcohol a una unidad de aminoácidos a través de un enlace amida, y se produce un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencilico y un agente citotóxico. Véase, por ejemplo, Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103. En una realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En ciertas realizaciones, la parte de fenileno de una unidad de p-amino bencilo está sustituida con Q_m , donde Q es alquilo $-C_1-C_8$, $-O$ -(alquilo C_1-C_8), $-$ halógeno, $-$ nitro o $-$ ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4. Entre los ejemplos de unidades espaciadoras autoinmolativas se incluyen además, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares a p-aminobencil alcohol (véase, por ejemplo, US 2005/0256030 A1), tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. Los espaciadores se puede utilizar para experimenta ciclaciones tras la hidrólisis del enlace amida, tal como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223); sistemas anulares biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55; 5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de glicina (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmolativos útiles en ADC.

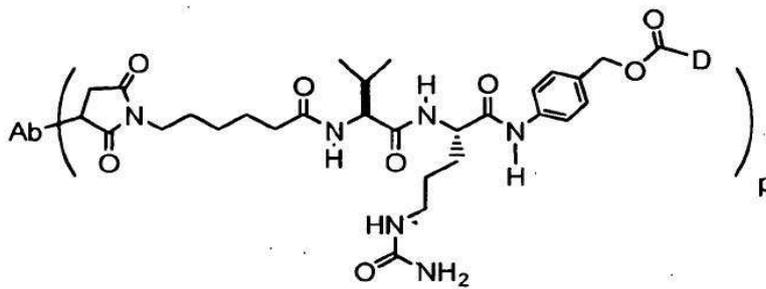
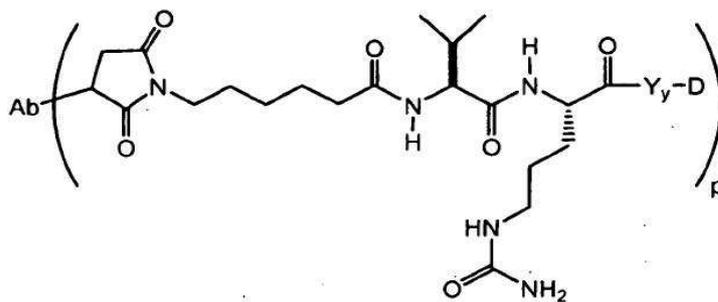
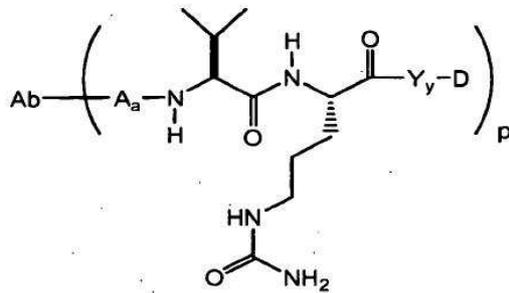
[0411] En una realización, una unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado tal como se describe a continuación, que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos.



en el que Q es alquilo $-C_1-C_8$, $-O$ -(alquilo C_1-C_8), $-$ halógeno, $-$ nitro o $-$ ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; n es 0 ó 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

[0412] En otra realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un grupo farmacológico a través de un grupo enlazador ramificador multifuncional a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar del fármaco con respecto al anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. De este modo, cuando un anticuerpo modificado con cisteínas porta sólo un grupo tiol de cisteína reactivo, se pueden unir una multitud de grupos farmacológicos a través de un enlazador dendrítico.

[0413] A continuación se muestran ejemplos de componentes enlazadores y combinaciones de los mismos en el contexto de ADC de fórmula II:



45 **[0414]** Los componentes enlazadores, incluyendo unidades de extensión, espaciadoras y de aminoácidos, se pueden sintetizar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en US 2005-0238649 A1.

50 **b. Grupos farmacológicos de ejemplo**

(1) Maitansina y maitansinoides

55 **[0415]** En algunas realizaciones, un inmunocombinado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 60 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

65 **[0416]** Los grupos farmacológicos de maitansinoides son grupos farmacológicos atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco porque: (i) son relativamente accesibles para prepararse mediante fermentación o modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son susceptibles de derivación con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlaces no disulfuro a anticuerpos, (iii) son estables en plasma y (iv) son

efectivos contra una variedad de líneas celulares de tumores.

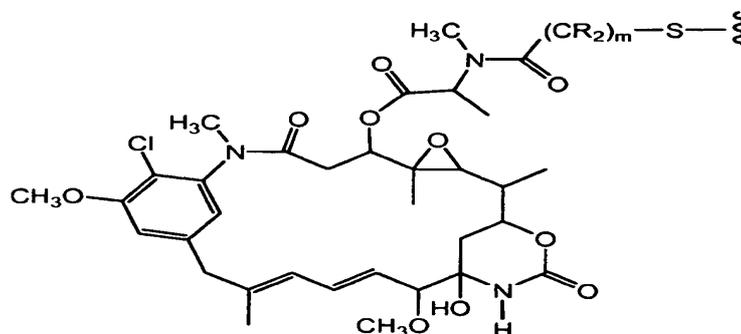
[0417] Los compuestos de maitansina adecuados para utilizar como grupos farmacológicos de maitansinoide son conocidos en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o producir utilizando técnicas de modificación genética y fermentación (US6790952; US 2005/0170475; Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). También se pueden preparar sintéticamente maitansinol y análogos de maitansinol según métodos conocidos.

[0418] Ente los grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo se incluyen los que tienen un anillo aromático modificado, tales como C-19-decloro (Patente de Estados Unidos No. 4256746) (preparado mediante la reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-decloro (Patente de Estados Unidos Nos. 4361650 y 4307016) (preparado mediante la desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o de cloración utilizando LAH); y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (Patente de Estados Unidos No. 4,294,757) (preparado mediante la acilación utilizando cloruros de acilo) y aquellos que presentan modificaciones en otras posiciones.

[0419] Ente los grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo también se incluyen los que presentan modificaciones tales como: C-9-SH (Patente de Estados Unidos No. 4424219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH₂OR)(US 4331598); C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Patente de Estados Unidos No. 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (US 4364866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (Patente de Estados Unidos Nos. 4313946 y 4315929) (aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (Patentes de Estados Unidos Nos. 4362663 y 4322348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (US 4371533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

[0420] Muchas posiciones en los compuestos de maitansina son conocidos por ser útiles como la posición de unión, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, para formar una unión éster, la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición c-20 que tiene un grupo hidroxilo son todos adecuados (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

[0421] Los grupos farmacológicos de maitansinoide incluyen aquellos que tienen la estructura:



donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del grupo farmacológico maitansinoide a un enlazador de un ADC. R puede ser independientemente H o un grupo alquilo C₁-C₆. La cadena de alquileo que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2, ó 3 (US 633410 ; US 5208020; US 7276497; Chari et al (1992) Cancer Res. 52:127-131; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623).

[0422] Se contemplan todos los estereoisómeros del grupo farmacológico de maitansinoide para los compuestos de la presente invención, es decir, cualquier combinación de las configuraciones R y S en los carbonos quirales de D. En una realización, el grupo farmacológico de maitansinoide tendrá la siguientes estereoquímica:

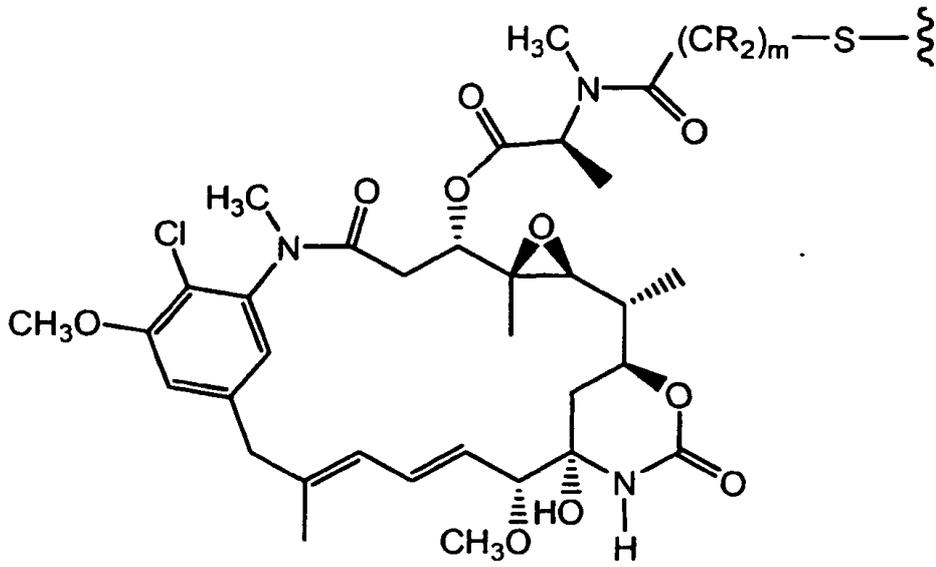
5

10

15

20

25

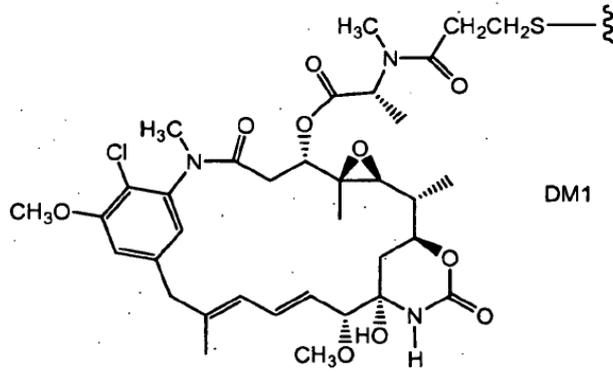


[0423] Realizaciones de grupos farmacológicos de maitansinoide de ejemplo incluyen DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:

30

35

40



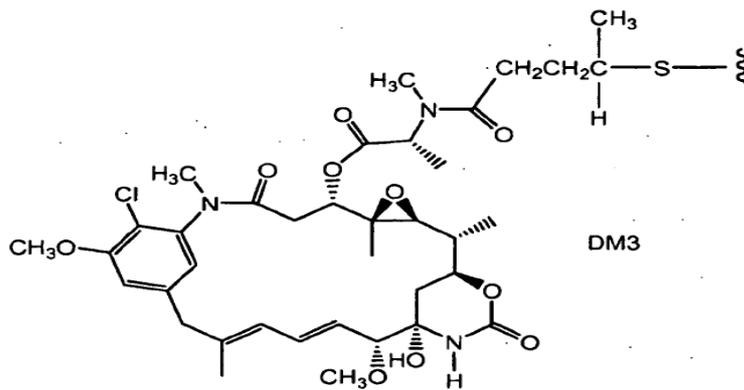
45

50

55

60

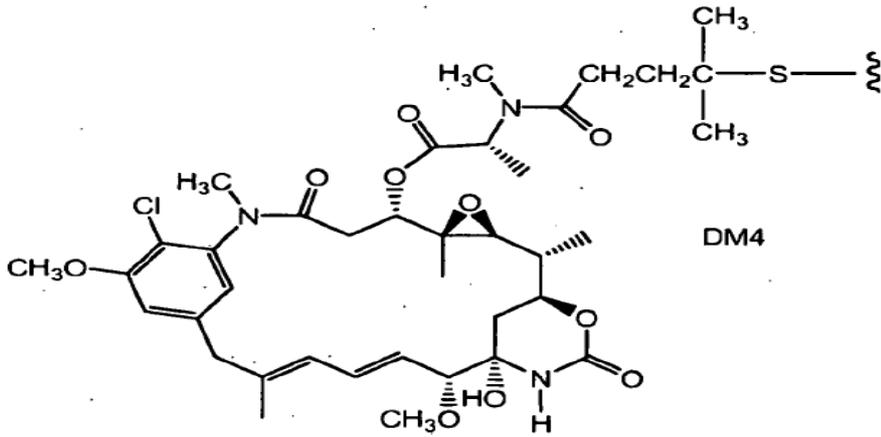
65



5

10

15



20

donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco al enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A).

25

[0424] Otros conjugados anticuerpo-fármaco de maitansinoide de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas, (donde Ab es anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 8):

30

35

40

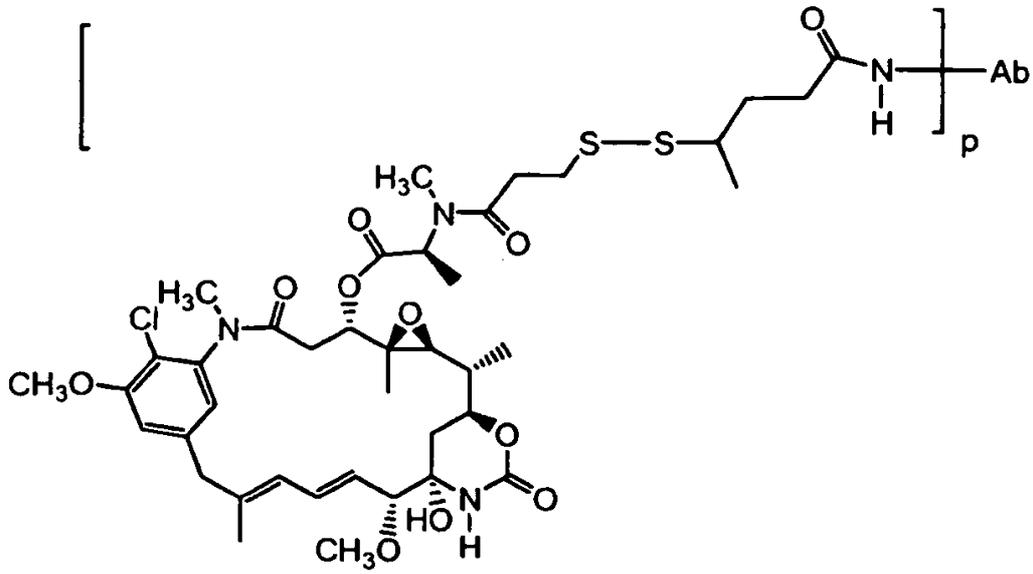
45

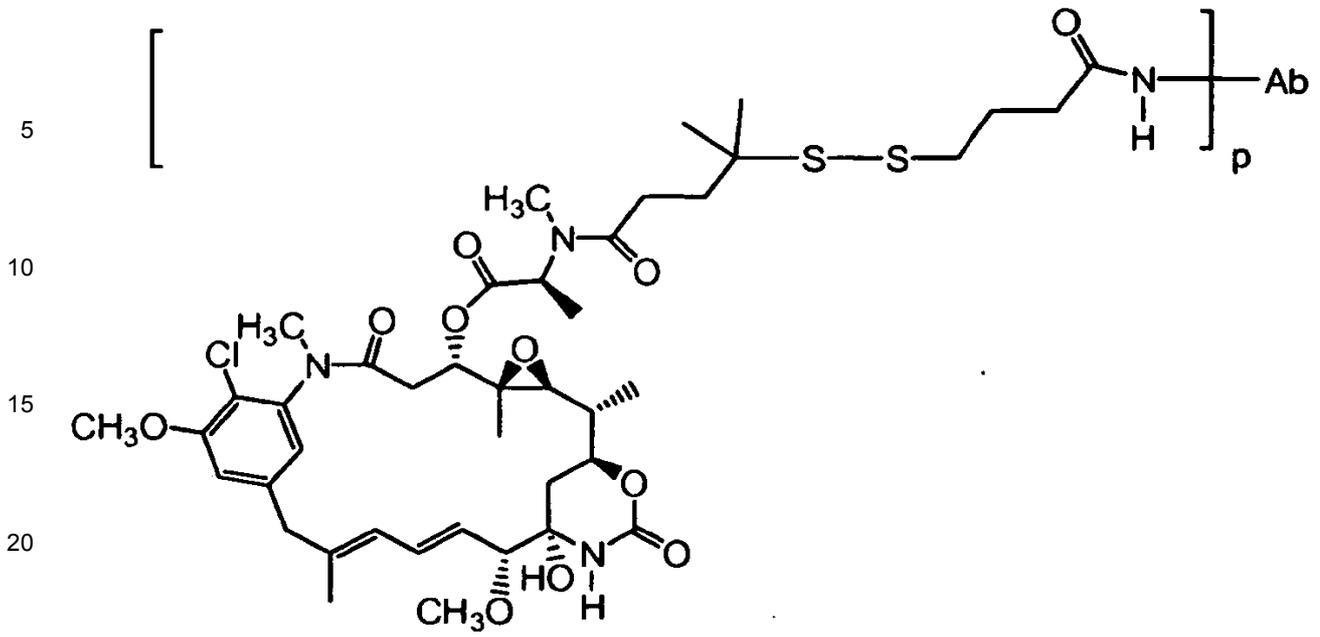
50

55

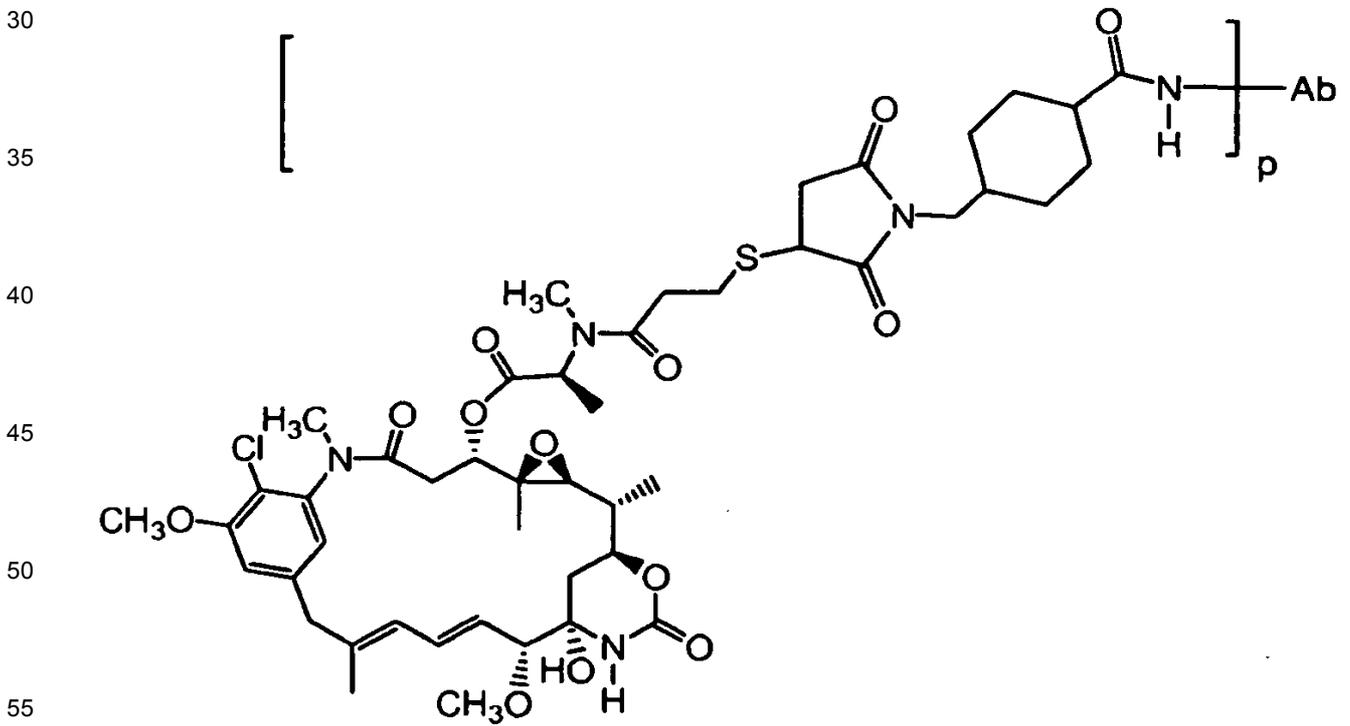
60

65





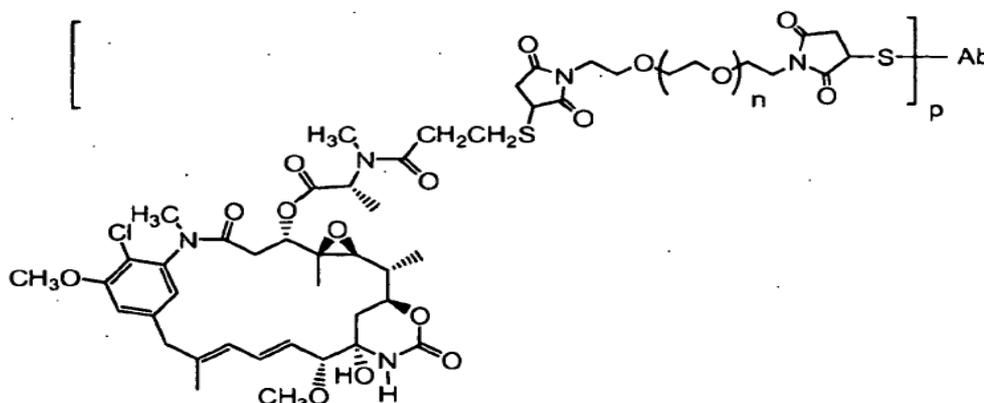
Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

60 [0425] Conjugados anticuerpo-fármaco de ejemplo donde DM1 está unido a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tiene la estructura y abreviatura:

65



donde Ab es anticuerpo; n es 0, 1, ó 2; y p es 1, 2, 3, ó 4.

[0426] Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos de fabricación de los mismos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en Erickson et al. (2006) Cancer Res. 66(8): 4426-4433; las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064, US 2005/0276812 A1 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente en la presente por referencia.

[0427] Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.208.020 (la descripción de la cual se incorpora expresamente en la presente por referencia). Los maitansinoides se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o se pueden aislar de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí, tales como maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0428] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) y US 2005/016993 A1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente en la presente por referencia. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar tal como se describe en US 2005/0276812 A1. "Antibody-drug conjugates and Methods." Los grupos enlazadores comprenden grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente. En la presente invención se describen y ejemplifican grupos enlazadores adicionales.

[0429] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0430] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

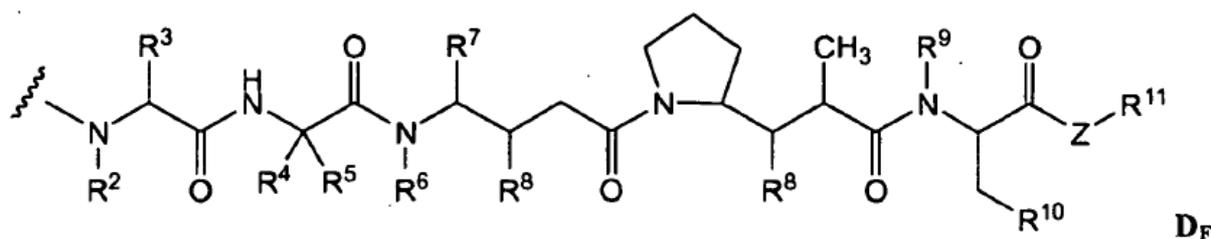
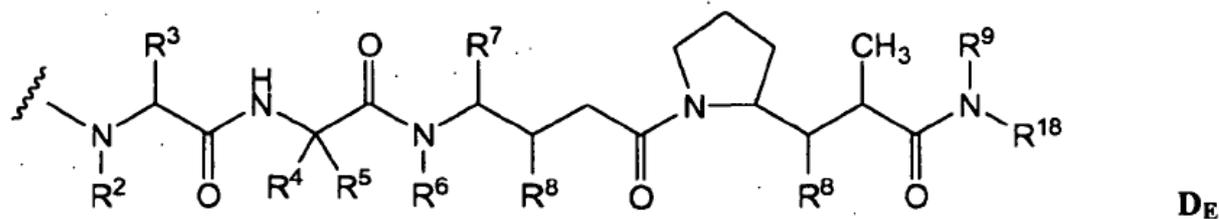
(2) Auristatinas y dolastatinas

[0431] En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastatina o un

análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patente de Estados Unidos Nos. 5635483; 5780588). Se han observado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (Patente de Estados Unidos No.5663149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo farmacológico de dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través del extremo N (amino) o C (carboxilo) del grupo farmacológico peptídico (WO 02/088172).

[0432] Las realizaciones de auristatina de ejemplo incluyen los grupos farmacológicos D_E y D_F de monometilauristatina unidos por el N terminal (US 2005/0238649 descritos en Senter et al, Proceedings de the American Association for Cancer Research, Volume 45, Resumen Número 623, presentado el 28 de marzo del 2004, la memoria de la cual se incorpora expresamente por referencia en su totalidad).

[0433] Un grupo farmacológico peptídico se puede seleccionar entre las fórmulas D_E y D_F siguientes:



40 donde la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente anticuerpo-enlazador, e independientemente en cada punto:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R³ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

45 R⁴ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona entre H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

50 R⁶ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

55 R¹⁰ se selecciona entre arilo o heterociclo C₃-C₈;

Z es O, S, NH, o NR¹², donde R¹² es alquilo C₁-C₈;

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴, o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un número entero que varía desde 1 a 1000;

R¹³ es alquilo C₂-C₈;

60 R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₈;

cada caso de R¹⁵ es independientemente H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, o -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈;

cada caso de R¹⁶ es independientemente H, alquilo C₁-C₈, o -(CH₂)_n-COOH;

R¹⁸ se selecciona entre -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈), y -C(R⁹)₂-C(R⁹)₂-(carbociclo C₃-C₉);

y

65 n es un número entero que varía de 0 a 6.

[0434] En una realización, R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es -H o metilo. En una realización de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es -H, y R^7 es sec-butilo.

[0435] En otra realización, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es -H.

[0436] En aún otra realización, cada caso de R^8 es $-OCH_3$.

[0437] En una realización de ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es -H, R^7 es secbutilo, cada caso de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es -H.

[0438] En una realización, Z es -O- o -NH-.

[0439] En una realización, R^{10} es arilo.

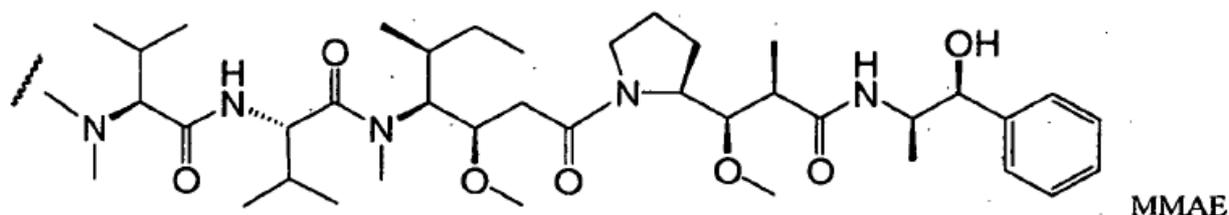
[0440] En una realización de ejemplo, R^{10} es -fenilo.

[0441] En una realización de ejemplo, cuando Z es -O-, R^{11} es -H, metilo o t-butilo.

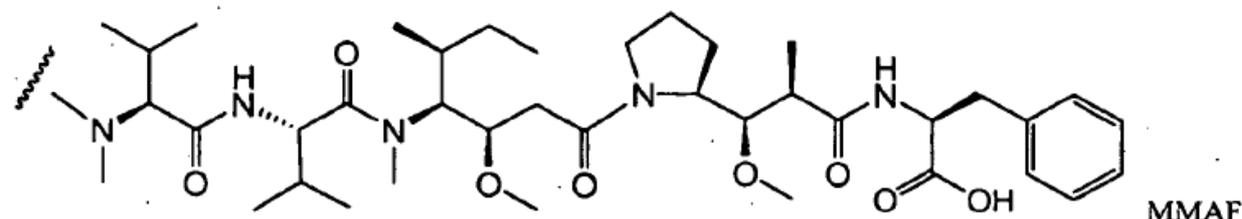
[0442] En una realización, cuando Z es -NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es alquilo $-C_1-C_6$ o $-(CH_2)_n-COOH$.

[0443] En otra realización, cuando Z es -NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

[0444] Una realización de auristatina de ejemplo de fórmula DE es MMAE, donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco:



[0445] Una realización de auristatina de ejemplo de fórmula DF es MMAF, donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco (véase US 2005/0238649 y Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124):

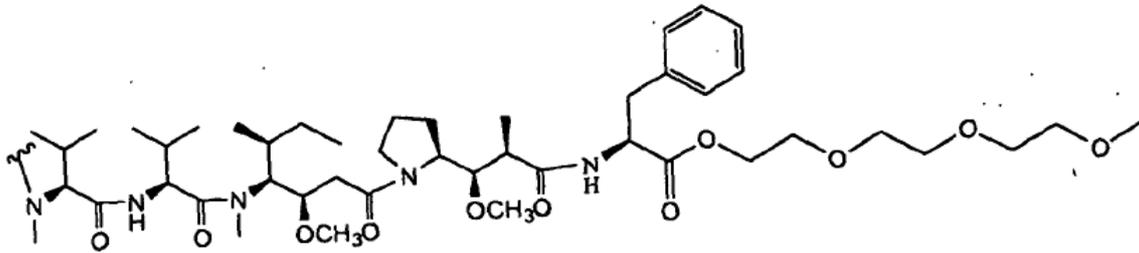


[0446] Otras realizaciones de ejemplos incluyen compuestos de monometilvalian que tienen modificaciones de carboxi de fenilalanina en el extremo C-terminal del grupo farmacológico de pentapéptido de auristatina (WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones en la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C-terminal del grupo farmacológico de pentapéptido de auristatina (WO 2007/008603).

[0447] Otros grupos farmacológicos incluyen los siguientes derivados de MMAF, donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (L) de un conjugado anticuerpo-fármaco

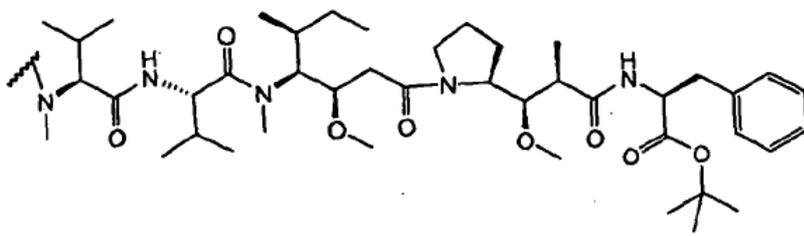
5

10



15

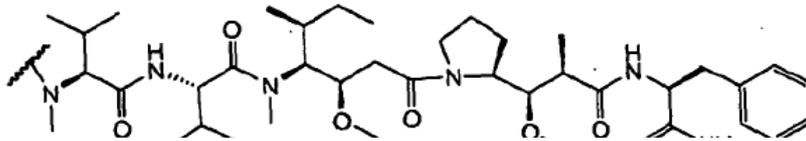
20



25

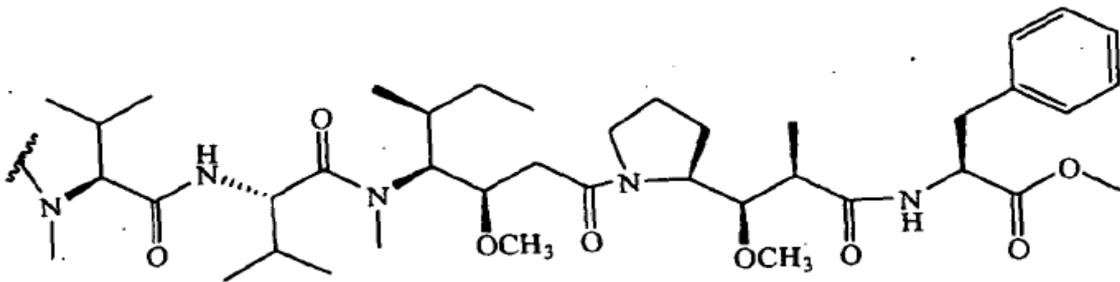
30

35



40

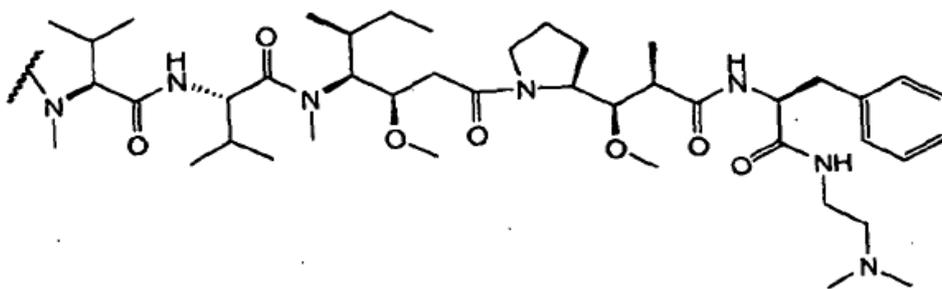
45



50

55

60



65

5

10

15

20

25

30

35

40

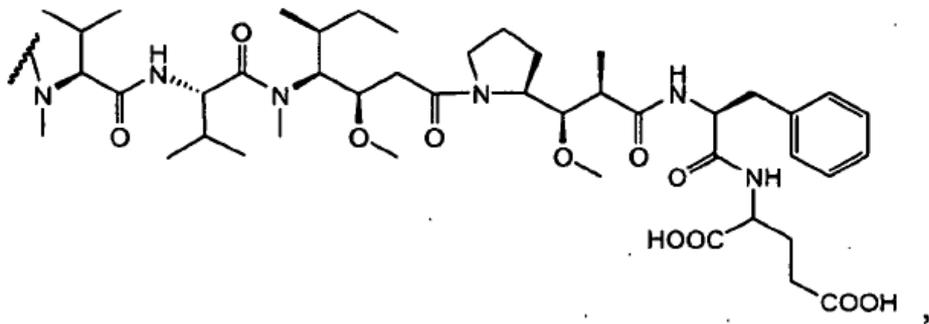
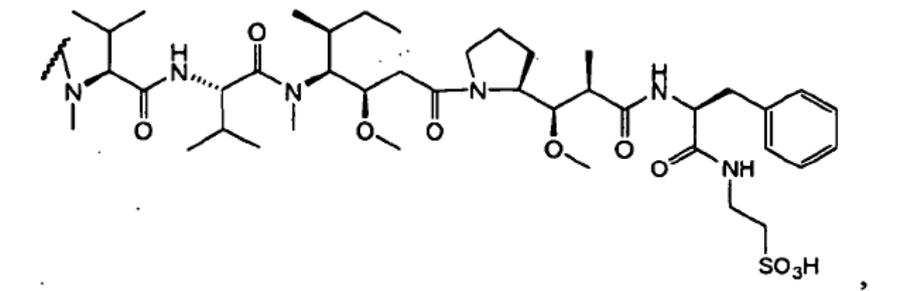
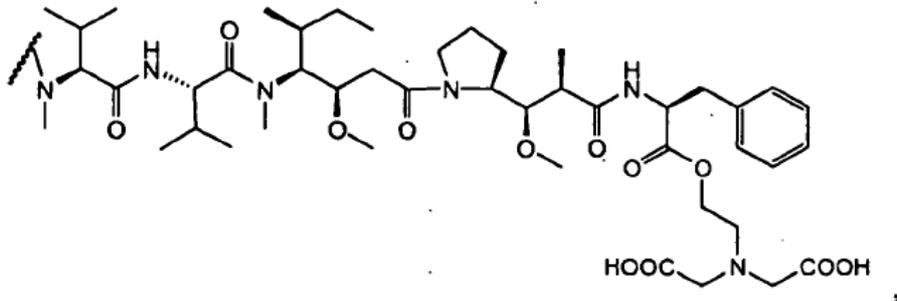
45

50

55

60

65



5 y

10

15

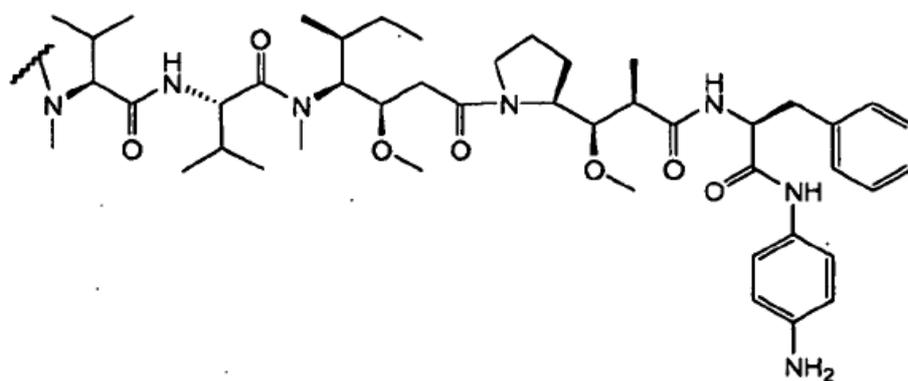
20

25

30

35

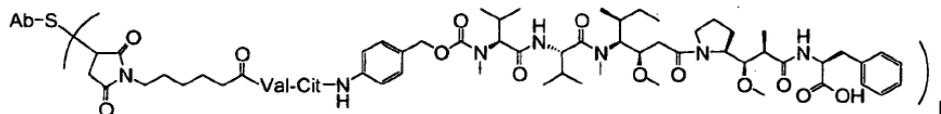
40



[0448] En un aspecto, los grupos hidrofílicos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de trietilenglicol (TEG), tal como se muestra anteriormente, se pueden unir al grupo farmacológico en R¹¹. Sin estar unido por ninguna teoría particular, los grupos hidrofílicos ayudan a la internalización y no aglomeración del grupo farmacológico.

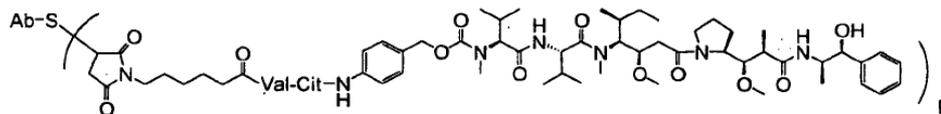
[0449] Las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o derivados de las mismas se describen en US 2005-0238649 A1 y Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124, que se incorpora expresamente aquí por referencia. Las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y varios componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde "Ab" es un anticuerpo; p es 1 a aproximadamente 8, "Val-Cit" o "vc" es un dipéptido valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre. Cabe indicar que en algunas de las descripciones de la estructura de ADC unido a azufre de la presente invención, el anticuerpo se representa como "Ab-S" simplemente para indicar la característica de enlace a azufre y no para indicar que un átomo de azufre particular porta múltiples grupos farmacológicos-enlazador. El paréntesis de la izquierda de las siguientes estructuras también se puede colocar a la izquierda del átomo de azufre, entre Ab y S, que sería una descripción equivalente de ADC de la invención descrito a lo largo de esta memoria.

45



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

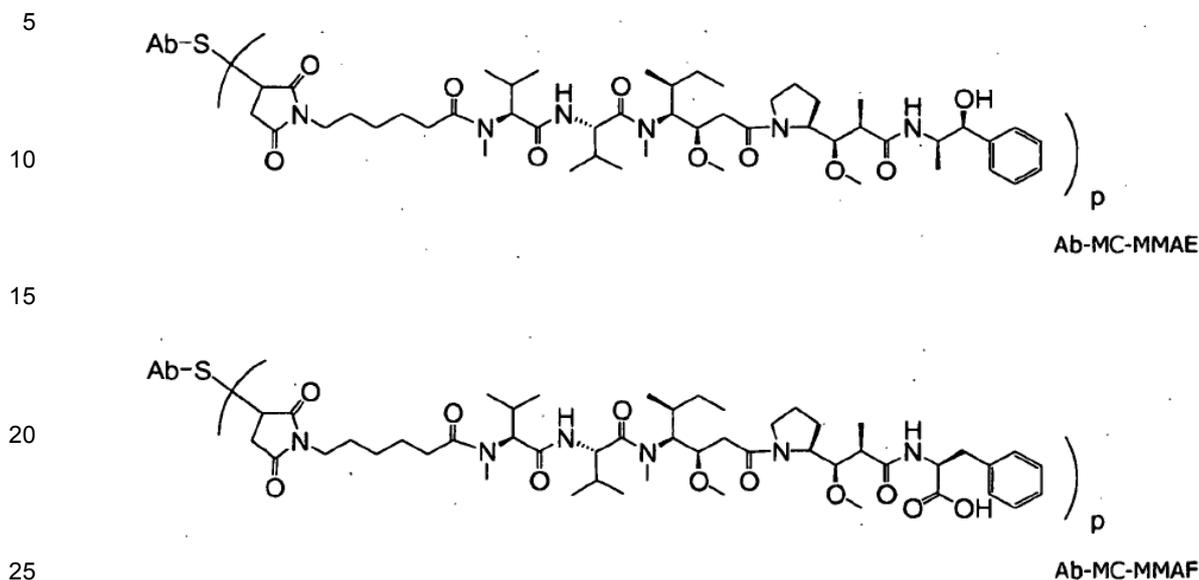
50



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

60

65



[0450] Las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I que comprenden MMAF y varios componentes enlazadores incluyen además Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. De manera destacada, se ha observado que los inmunocombinados que comprenden MMAF unida a un anticuerpo mediante un enlazador que no divisible proteolíticamente poseen una actividad comparable a inmunocombinados que comprenden MMAF unida a un anticuerpo mediante un enlazador divisible proteolíticamente. Véase Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. En dichos casos, se cree que la liberación de fármaco se realiza mediante la degradación del anticuerpo en la célula.

[0451] Habitualmente, pueden prepararse grupos farmacológicos a base de péptidos mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos de US 2005-0238649 A1; US 5.635.483 y US 5.780.588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R, et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; y Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

[0452] En particular, los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina de fórmula D_F, tal como MMAF y derivados de la misma, se pueden preparar utilizando métodos descritos en US 2005-0238649 A1 y Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. Los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina de fórmula D_E, tal como MMAE y derivados de la misma, se pueden preparar utilizando métodos descritos en Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784. Los grupos de enlazadores a fármaco MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PABMMAF, y MC-vc-PAB-MMAE se pueden sintetizar de manera conveniente mediante métodos de rutina, por ejemplo, tal como se describe en Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784, y la publicación de la solicitud de patente No. US 2005/0238649 A1, y a continuación se conjugan a un anticuerpo de interés.

(3) Caliqueamicina

[0453] En otras realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ^1 , α^1 , α^3 , N-acetil- γ^1 , PSAG, y θ^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

c. Otros agentes citotóxicos

5 [0454] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

10 [0455] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

15 [0456] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa)

20 [0457] En ciertas realizaciones, el inmunoconjugado puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el inmunoconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

30 [0458] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el inmunoconjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

35 [0459] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo conjugado a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un fármaco activo, tal como un fármaco anticanceroso. Dichos inmunoconjugados son útiles en la terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT). Las enzimas que se pueden conjugar a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fosfatasas alcalinas, que son útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, que es útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa, que son útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa, que es útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas se pueden unir covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

d. Carga de fármaco

55 [0460] La carga de fármaco se representa por p, el número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármacos puede variar desde 1 a 20 grupos farmacológicos (D) por anticuerpo. Los ADC de Fórmula I incluyen grupos de anticuerpos conjugados con un grupo de grupos farmacológicos, de 1 a 20. El número promedio de grupos farmacológicos por anticuerpo en preparaciones de ADC de las reacciones de conjugación se pueden caracterizar mediante medios convencionales, tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, también se puede conseguir la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco mediante medios, tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Las formulaciones farmacéuticas de conjugados de anticuerpo-fármaco de fórmula I pueden ser de este modo una mezcla heterogénea de dichos conjugados con anticuerpos unidos a 1, 2, 3, 65 4 o más grupos farmacológicos.

[0461] Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión en un tiol de cisteína, como en las realizaciones de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos de tiol de cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los cuales se puede unir un enlazador. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco más elevada, por ejemplo $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la presente invención varía desde 1 hasta aproximadamente 8; desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6; o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5. De hecho, se ha observado que para ciertos ADC, la proporción óptima de grupos farmacológicos por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5. Véase US 2005-0238649 A1.

[0462] En ciertas realizaciones, se conjugan menos del máximo teórico de grupos farmacológicos a un anticuerpo durante la reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermedio enlazador del fármaco o el reactivo enlazador, tal como se describe a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se puedan unir a un grupo farmacológico; de hecho, la mayoría de residuos de tiol de cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), bajo condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos de tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos, tales como lisina o cisteína.

[0463] La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo, mediante: (i) la imitación del exceso molar de intermedio enlazador a fármaco o reactivo enlazador en relación al anticuerpo, (ii) la limitación del tiempo de reacción o la temperatura de conjugación, y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

[0464] Debe entenderse que cuando reacciona más de un grupo nucleofílico con un intermedio del enlazador a fármaco o reactivo enlazador seguido de un reactivo grupo farmacológico, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más grupos farmacológicos unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo dual de anticuerpos ELISA, que es específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas individuales de ADC se pueden identificar en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica (véase, por ejemplo, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Resumen No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings de the AACR, Volumen 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location de drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, Marzo 27-31, 2004, Proceedings de the AACR, Volumen 45, Marzo 2004). En ciertas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga se puede aislar de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

e. Algunos métodos de preparación de inmunoconjugados

[0465] Un ADC de fórmula I se puede preparar mediante varias rutas que utilizan reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo farmacológico D; y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Métodos de ejemplo para preparar un ADC de fórmula I a través de la última ruta se describen en US 2005-0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

[0466] Entre los grupos nucleofílicos en los anticuerpos se incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amina de azúcares donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos presentan enlaces disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotioneitol) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de manera que el anticuerpo es totalmente o parcialmente reducido. Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la modificación de residuos de lisina, por ejemplo, mediante la reacción de residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando lugar a la conversión de una amina en tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en un anticuerpo mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más

residuos de cisteína (por ejemplo, mediante la preparación de anticuerpos variantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

[0467] Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención también se pueden producir mediante la reacción entre un grupo electrofílico en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleofílico en un reactivo enlazador o fármaco. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo enlazador se incluyen, pero sin limitación, hidrazina, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una realización, se modifica un anticuerpo para introducir grupos electrofílicos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. En otra realización, los azúcares de anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o grupos farmacológicos. Los grupos resultantes de iminas base de Schiff pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen los residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico dando lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un nucleófilo de grupo farmacológico o enlazador.

[0468] Entre los grupos nucleofílicos en un grupo farmacológico se incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tilo, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.

[0469] Los compuestos de la presente invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con los siguientes reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que está disponible comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véase las páginas 467-495, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[0470] Los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metil dietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0471] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y partes citotóxicas del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0472] En otra realización, un anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el reconocimiento de un tumor, en la que se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Inmunoconjugados de ejemplo – conjugados de anticuerpo-tio y fármaco

a. Preparación de anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína

[0473] El ADN que codifica una secuencia variante de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína y anticuerpos anti-CD79b originales (parentales) de la invención se prepara mediante un conjunto de métodos que incluyen, sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales), preparación por mutagénesis dirigida de sitio (o mediada por oligonucleótidos) (Carter

(1985) et al *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho et al (1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59; Kunkel et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488; Liu et al (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260), mutagénesis PCR (Higuchi, (1990) en *PCR Protocols*, pp.177-183. Academic Press; Ito et al (1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard et al (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; and Vallette et al (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733), y mutagénesis de cassette (Wells et al (1985) *Gene* 34:315-323) de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Los protocolos de mutagénesis, kits, y reactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo el kit QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones individuales también se generan mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando un ADN plasmídico de doble cadena como plantilla mediante la mutagénesis basada en PCR (Sambrook and Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Zoller et al (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500). Las variantes de anticuerpos recombinantes se pueden construir también mediante la manipulación del fragmento de restricción o mediante el solpamaineto de la extensión PCR con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la sustitución o sustituciones en el codón de cisteína. Las técnicas de mutagénesis estándar se pueden utilizar para generar ADN que codifica dichos anticuerpos modificados con cisteínas mutantes (Sambrook et al *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Ausubel et al *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience. New York, N.Y., 1993).

[0474] La tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos anti-CD79b humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena única del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. (Johnson et al (1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571; Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Griffith et al (1993) *EMBO J.* 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

[0475] Los anticuerpos anti-CD79b se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. La secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se puede producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). La síntesis in vitro de proteínas se puede realizar utilizando técnicas de manual o automatismos. La síntesis automatizada en fase sólida se puede realizar, por ejemplo, utilizando aminoácidos protegidos con t-BOC o Fmoc y utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Varias partes del anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b se pueden sintetizar químicamente por separado y combinarse utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b deseado.

[0476] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)) o se producían directamente por célula huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo anti-CD79b Fab, Fv y ScFv se pueden expresar y secretar de *E. Coli*, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas aquí. Alternativamente, los fragmentos Fab¹-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)) o aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. El anticuerpo anti-CD79b puede ser un fragmento Fv de cadena única (scFv) (WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458). El fragmento de anticuerpo anti-CD79b también puede ser un "anticuerpo lineal" (Patente de Estados Unidos No. 5.641.870). Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

[0477] La descripción siguiente se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-CD79b mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b. El ADN que codifica los anticuerpos anti-CD79b se puede obtener de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de anticuerpo anti-CD79b y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b humano se puede obtener convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

[0478] Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten que los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína sean reactivos con funcionalidades electrofílicas. Estos métodos permiten además que anticuerpos se conjuguen a compuestos, tales como compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) con

moléculas de fármacos en los sitios designados, diseñados y selectivos. Los residuos de cisteína reactivos en la superficie de un anticuerpo permiten específicamente la conjugación de un grupo farmacológico a través de un grupo reactivo tiol, tal como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad tiol de un residuo de Cys en un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad específica de tiol en los reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren pH superiores (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). La cantidad de tiol libre en una proteína se puede estimar mediante el ensayo de Ellman estándar. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero unido a disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con puentes disulfuro internos que unen las subunidades. En proteínas tales como ésta, la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo, tal como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304: 147-156) es necesaria para generar el tiol libre reactivo. Esta estrategia puede dar lugar a una pérdida de estructura terciaria del anticuerpo y de especificidad de unión a antígeno.

[0479] El ensayo PHESELECTOR (Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en anticuerpos en un forma de fagos para ELISA ayudando así en el diseño de anticuerpos modificados con cisteínas (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; WO 2006/034488; US 20007/0092940). El anticuerpo modificado con cisteínas recubre las superficies del pocillo, seguido de la incubación con partículas de fago, la adición de anticuerpo secundario marcado con HRP y la detección de la absorbancia. Las proteínas mutantes expresadas en fagos se pueden cribar de una manera rápida, robusta con alto rendimiento. Las bibliotecas de anticuerpos modificados con cisteínas se pueden producir y someter a la selección de unión utilizando la misma estrategia para identificar sitios apropiadamente reactivos de incorporación de Cys libres a partir de bibliotecas de anticuerpos u otras proteínas en fagos de proteínas aleatorias. Esta técnica incluye la reacción de proteínas mutantes de cisteína expresadas en fagos con un reactivo de afinidad o grupo informador que también es reactivo con tiol.

[0480] El ensayo PHESELECTOR permite el cribado de grupos tiol reactivos en anticuerpos. La identificación de la variante A121C por este método es un ejemplo. La molécula Fab completa se puede buscar de manera eficaz para identificar más variantes de TioFab con grupos tiol reactivos. Se utilizó un parámetro, accesibilidad de la superficie fraccionaria, para identificar y cuantificar la accesibilidad del disolvente a los residuos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad de la superficie se puede expresar como el área superficial (\AA^2) que se puede poner en contacto por una molécula disolvente, por ejemplo agua. El espacio ocupado de agua es aproximadamente una esfera de radio 1,4 \AA . El software está libremente disponible o licenciable (para CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, o por internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como suite CCP4 de programas de cristalografía que utiliza algoritmos para calcular la accesibilidad de superficie de cada aminoácido de una proteína con coordenadas conocidas derivadas de cristalografía con rayos X ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Dos módulos de software de ejemplo que realizan los cálculos de accesibilidad de superficie son "AREAIMOL" y "SURFACE", en base a los algoritmos de B.Lee y F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400. AREAIMOL define la superficie accesible a disolvente de una proteína como el locus del centro de una esfera sonda (que representa una molécula de disolvente) a medida que gira sobre la superficie de Van der Waals surface de la proteína. AREAIMOL calcula el área superficie accesible al disolvente mediante la generación de puntos de superficie en una esfera extendida sobre cada átomo (a una distancia desde el centro del átomo igual a la suma del átomo y los radios de sondas) y la eliminación de aquellos que se encuentran en esferas equivalentes asociadas con átomos vecinos. AREAIMOL encuentra el área accesible a disolvente de átomos en un archivo de coordenadas PDB y resume el área accesible por residuo, por cadena y para la molécula completa. Las áreas accesibles (o diferencias de áreas) para átomos individuales se puede escribir en un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL asume un radio único para cada elemento y sólo reconoce un número limitado de elementos diferentes.

[0481] AREAIMOL y SURFACE describen accesibilidades absolutas, es decir el número de Angstroms (A) al cuadrado. La accesibilidad de superficie fraccionada se calcula en referencia a un estado estándar relevante para un aminoácido en un polipéptido. El estado de referencia es un tripéptido Gly-X-Gly, donde X es el aminoácido de interés y el estado de referencia debe estar en una conformación "extendida", es decir como las de las cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área de accesibilidad calculada se divide por el área accesible en un estado de referencia de tripéptido Gly-X-Gly y describe el cociente, que es la accesibilidad fraccionada. El porcentaje de accesibilidad es la accesibilidad fraccionada multiplicada por 100. Otro algoritmo de ejemplo para calcular la accesibilidad de la superficie se basa en el módulo SOLV del programa xsa (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche. Basel) que calcula la accesibilidad fraccionada de un residuo de aminoácido con respecto a una esfera de agua en base a las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad de superficie fraccionada para cada aminoácido en un anticuerpo se puede calcular utilizando la información de la estructura cristalina (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995).

[0482] El ADN que codifica los anticuerpos modificados con cisteínas se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión,

que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células E. coli, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), u otras células huésped de mamífero, tales como células de mieloma (US 58077715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que de otro modo no producen la proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

[0483] Después del diseño y selección, se pueden producir anticuerpos modificados con cisteínas, por ejemplo, TioFabs, con residuos Cys diseñados no emparejados altamente reactivos, "aminoácidos de cisteína libres", mediante: (i) la expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo E. coli, (Skerra et al (1993) Curr. Opinión in Immunol. 5:256-262; Plückerthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188) o un sistema de cultivo de células de mamífero (WO 01/00245), por ejemplo células de Ovario de Hámster Chino (CHO); y (ii) purificación utilizando técnicas comunes de purificación de proteínas (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988).

[0484] Los grupos tiol de Cys diseñados reaccionan con reactivos enlazadores electrofílicos e intermedios enlazadores de fármacos para formar conjugados de anticuerpo y fármaco modificados con cisteínas y otros anticuerpos modificados con cisteínas marcados. Los residuos de Cys de anticuerpos modificados con cisteínas y presentes en los anticuerpos parentales, que están emparejados y forman puentes disulfuro intercadenas e intracadenas no tienen ningún grupo tiol reactivo (a menos que se trate con un agente reductor) y no reaccionan con reactivos enlazadores electrofílicos o intermedios enlazadores de fármacos. El residuo de Cys recién diseñado puede permanecer sin emparejarse y ser capaz de reaccionar con, es decir conjugarse a, un reactivo enlazador electrofílico o intermedio enlazador de fármacos, tal como una maleimida-fármaco. Entre los intermedios enlazadores de fármacos de ejemplo se incluyen: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE, y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones de estructura de los residuos de Cys diseñados de las cadenas pesada y ligera se enumeran según un sistema de numeración secuencial. Este sistema secuencia de numeración se correlaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences de Proteins de Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes de Health, Bethesda, MD) que empieza en el N-terminal, difiere del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) en las inserciones indicadas por a,b,c. Utilizando el sistema de numeración Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Los sitios variantes de la cadena pesada modificada con cisteínas se identifican por la numeración secuencia y los esquemas de numeración de Kabat.

[0485] En una realización, el anticuerpo anti-Cd79b modificado con cisteínas se prepara mediante un proceso que comprende:

- (a) sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína; y
- (b) determinar la reactividad tiol del anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas mediante la reacción del anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo reactivo con tiol.

[0486] El anticuerpo modificado con cisteínas puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo reactivo con tiol.

[0487] Los residuos de aminoácidos de cisteína libres se pueden localizar en las cadenas pesada o ligera o en los dominios constante o variable. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo Fab, también se pueden diseñar con uno o más aminoácidos de cisteína que sustituyen los aminoácidos del fragmento de anticuerpo para formar los fragmentos de anticuerpo modificados con cisteínas.

[0488] Otra realización de la invención proporciona un método de preparación (fabricación) de un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas, que comprende:

- (a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti-CD79b parental a efectos de generar un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas; y
- (b) determinar la reactividad del tiol del anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo reactivo con tiol; donde el anticuerpo modificado con cisteínas es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo reactivo con tiol.

La etapa (a) del método de preparación de un anticuerpo modificado con cisteínas puede comprender:

- (i) mutagenizar una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo modificado con cisteínas;
- (ii) expresar el anticuerpo modificado con cisteínas; y
- (iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado con cisteínas.

[0489] La etapa (b) del método de preparación de un anticuerpo modificado con cisteínas puede comprender expresar el anticuerpo modificado con cisteínas en una partícula viral seleccionada entre un fago o una partícula de fagémido.

[0490] La etapa (b) del método de preparación de un anticuerpo modificado con cisteínas puede comprender también:

- (i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad; y
- (ii) medir la unión del anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad a un medio de captura.

[0491] Otra realización de la invención es un método de cribado de anticuerpos modificados con cisteínas con aminoácidos de cisteína no emparejados altamente reactivos para la reactividad con tiol que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental a efectos de generar un anticuerpo modificado con cisteínas

5 (b) hacer reaccionar el anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad; y

(c) medir la unión del anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad a un medio de captura, y

(d) determinar la reactividad de tiol del anticuerpo modificado con cisteínas con el reactivo reactivo con tiol.

10 **[0492]** La etapa (a) del método de cribado de anticuerpos modificados con cisteínas puede comprender:

(i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo modificado con cisteínas;

(ii) expresar el anticuerpo modificado con cisteínas; y

(iii) aislar y purificar el anticuerpo modificado con cisteínas.

15 **[0493]** La etapa (b) del método de cribado de anticuerpos modificados con cisteínas puede comprender expresar el anticuerpo modificado con cisteínas en una partícula viral seleccionada entre un fago o una partícula de fagémido.

[0494] La etapa (b) del método de cribado de anticuerpos modificados con cisteínas también puede comprender:

20 (i) hacer reaccionar el anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo con afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad; y

(ii) medir la unión del anticuerpo modificado con cisteínas marcado para afinidad a un medio de captura

b. Diseño de cisteínas de variantes IgG anti-CD79b

25 **[0495]** La cisteína se introdujo en la cadena pesada en el sitio 118 (en numeración EU) (equivalente a la posición 118 en la cadena pesada, número secuencial) en los anticuerpos anti-CD79b monoclonales parentales quiméricos de longitud completa o en la cadena ligera en el sitio 205 (Numeración Kabat) (equivalente a la posición 210 de la cadena ligera, numeración secuencial) en los anticuerpos anti-CD79b monoclonales parentales quiméricos de longitud completa mediante los métodos de diseño de cisteínas descritos aquí.

30 **[0496]** Los anticuerpos modificados con cisteínas con cisteína en 118 de la cadena pesada (en numeración EU) generados fueron: (a) tio-hu2F2.D7-HC(A118C) con la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 85) y la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 86), Figura 17.

35 **[0497]** Los anticuerpos modificados con cisteínas con cisteína en 205 de la cadena ligera (en numeración Kabat) generados fueron: (a) tio-hu2F2.D7-LC(V205C) con la secuencia de cadena pesada (SEQ ID NO: 87) y la secuencia de cadena ligera (SEQ ID NO: 88), Figura 18.

40 **[0498]** Estos anticuerpos monoclonales modificados con cisteínas se expresaron en células CHO (Ovario de Hámster Chino) mediante fermentación transitoria en medios que contienen cisteína 1 mM.

45 **[0499]** Según una realización, los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína 2F2 humanizados comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadenas pesadas con un aminoácido de cisteína libre (SEQ ID NOs: 91-99, Tabla 2).

Tabla 2: Comparación de la numeración secuencial, Kabat y EU de la cadena pesada para variantes de anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas de 2F2 humanizado

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN KABAT	NUMERACIÓN EU	SEQ ID NO:
EVQLCESGGG	V5C	V5C		91
LRLSCCASYT	A23C	A23C		92
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C		93
TLVTVCASATK	S112C	S112C		94
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	95
VSSASCKGPSV	T116C	T116C	T120C	96
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	97
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	98
PPVLDCDGSFF	S396C	S396C	S400C	99

50 **[0500]** Según una realización, los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas 2F2 quiméricos comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena pesada con un aminoácido de cisteína libre (SEQ ID NOs: 100-108, Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de la numeración secuencial, Kabat y EU de la cadena pesada para variantes de anticuerpo

anti-CD79b modificados con cisteínas de ch2F2

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN KABAT	NUMERACIÓN EU	SEQ ID NO:
QVQLCQPGAE	Q5C	Q5C		100
VKLSCCASGYT	K23C	K23C		101
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		102
TSVTVCLASTK	S112C	S112C		103
VTVSSCSTKGP	A114C	A114C	A118C	104
VSSASCKGPSV	T116C	T116C	T120C	105
WYVDGCEVHNA	V278C	V278C	V282C	106
KGFYPCDIAVE	S371C	S371C	S375C	107
PPVLD C DGSFF	S396C	S396C	S400C	108

5 **[0501]** Según una realización, los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína 2F2 humanizado que comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena ligera con un aminoácido de cisteína libre (SEQ ID NOs: 109-115, Tabla 4).

10 Tabla 4: Comparación de la numeración secuencial y Kabat de la cadena ligera para variantes de anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas de 2F2 humanizados

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN KABAT	SEQ ID NO:
SLSASCGDRV T	V15C	V15C	109
EIKRT C AAPSV	V115C	V110C	110
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	111
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	112
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	113
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	114
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	115

15 **[0502]** Según una realización, los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas 2F2 quiméricos comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena ligera con un aminoácido de cisteína libre (SEQ ID NOs: 116-122, Tabla 5).

20 Tabla 5: Comparación de la numeración secuencial y Kabat de la cadena ligera para variantes de anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas de 2F2 quimérico

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN KABAT	SEQ ID NO:
TLSVT C GQPAS	I15C	I15C	116
EIKRT C AAPSV	V115C	V110C	117
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	118
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	119
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	120
VTEQDCKDSTY	S173V	S168V	121
GLSSP C TKSFN	V210C	V205C	122

c. Anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína marcados

25 **[0503]** Los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas se pueden acoplar específicamente en sitio y de manera eficaz con un reactivo reactivo con tiol. El reactivo reactivo con tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo marcador de captura, es decir de afinidad, (por ejemplo, un reactivo enlazador de biotina), un marcador de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización en fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, poliestireno, o vidrio), o un intermedio enlazador de fármaco. Un ejemplo de un reactivo reactivo con tiol es N-etil maleimida (NEM). En una realización de ejemplo, la reacción de un TioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un TioFab biotinilado mediante el cual la presencia y reactividad del residuo de cisteína diseñado se puede detectar y medir. La reacción de un TioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un TioFab con un enlazador funcionalizado que se puede hacer reaccionar posteriormente con un reactivo de grupo farmacológico u otro marcador. La reacción de un TioFab con un intermedio enlazador de fármaco proporciona un conjugado de fármaco y TioFab.

35

[0504] Los métodos de ejemplo descritos aquí se pueden aplicar en general a la identificación y producción de anticuerpos, y más en general, a otras proteínas a través de la aplicación de las etapas de diseño y cribado descritas aquí.

[0505] Dicha estrategia se puede aplicar a la conjugación de otros reactivos reactivos con tiol en que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otro ayudante de conjugación reactivo con tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook de Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; German. 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press. San Diego, pp. 40-55, 643-671). El reactivo reactivo con tiol puede ser un grupo farmacológico, un fluoróforo, tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para obtención de imágenes o metal radioterapéutico, un marcador o etiqueta de detección de peptidilo o no peptidilo, o un agente modificador del aclarado, tales como varios símeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro agente carbohidrato o lipofílico.

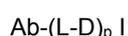
d. Usos de anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína

[0506] Los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteína, y conjugados de los mismos pueden ser útiles como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. La presente invención proporciona además métodos de prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno relacionado con células B. En particular, la presente invención proporciona métodos de prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto. La presente invención proporciona además métodos para el diagnóstico de un trastorno relacionado con CD79b o la predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como métodos para identificar anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, que preferencialmente se unen a polipéptidos CD79b asociados a células B.

[0507] Otra realización de la presente invención está dirigida al uso de un anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una patología que es sensible a un trastorno relacionado con células B.

e. Anticuerpo modificado con cisteínas Drug Conjugates (Tio-antibody Drug Conjugates (TDCs))

[0508] Otro aspecto de la invención es un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas (Ab), y un grupo farmacológico de auristatina (D) donde el anticuerpo modificado con cisteínas está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres por un grupo enlazador (L) a D; teniendo el compuesto la fórmula I:



donde p es 1, 2, 3, ó 4; y donde el anticuerpo modificado con cisteínas se prepara mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por uno o más aminoácidos de cisteína libres.

[0509] Otro aspecto de the invention es una composición que comprende una mezcla de compuestos de anticuerpo y fármaco de Fórmula I, donde la carga promedio de fármaco por anticuerpo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

[0510] Las figuras 24-28 y 48-49 muestran realizaciones conjugados de fármaco y anticuerpo anti-Cd79b modificados con cisteínas (ADC) donde un grupo farmacológico de auristatina está unido a un grupo de cisteína diseñado en: la cadena ligera (LC-ADC) o la cadena pesada (HC-ADC).

[0511] Las ventajas potenciales de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteínas incluyen una mejor seguridad (mayor índice terapéutica), mejores parámetros PK, se mantienen los enlaces disulfuro intercadenas del anticuerpo que pueden estabilizar el conjugado y mantener su conformación de unión activa, los sitios de la conjugación al fármaco están definidos y la preparación del conjugado de fármaco y anticuerpo modificado con cisteínas a partir de la conjugación de anticuerpos modificados con cisteínas a reactivos enlazadores de fármacos da lugar a un producto más homogéneo.

Enlazadores

[0512] "Enlazador", "Unidad enlazadora", o "enlace" significa un grupo químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un grupo farmacológico. En varias realizaciones, un enlazador se especifica como L. Un "enlazador" (L) es un grupo bifuncional o multifuncional que se puede utilizar

para unir uno o más grupos farmacológicos (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de fórmula I. Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) se pueden preparar convenientemente utilizando un enlazador que tiene una funcionalidad reactiva para la unión al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) modificado con cisteínas puede formar un enlace con un grupo funcional electrofílico de un reactivo enlazador, un grupo farmacológico o un intermedio enlazador de fármaco.

[0513] En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrofílico que es reactivo a una cisteína nucleofílica presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrofílico en un enlazador y forma un enlace covalente con un enlazador. Entre los grupos electrofílicos útiles se incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

[0514] Los enlazadores incluyen un radical divalente, tal como alquildilio, un arileno, un heteroarileno, grupos tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo polietilenoamino, Jeffamine™); y éster de diácido y amidas incluyendo succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

[0515] Los anticuerpos modificados con cisteínas reaccionan con reactivos enlazadores o intermedios enlazadores de fármacos, con grupos funcionales electrofílicos, tales como maleimida o α -halo carbonilo, según el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, y según el protocolo del Ejemplo 6.

[0516] El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Ejemplos de componentes enlazadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("alape" o "af"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"), etilenoxi $-CH_2CH_2O-$ como una o más unidades repetitivas ("EO" o "PEO"). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la técnica y algunos se describen aquí.

[0517] En una realización, el enlazador L de un ADC tiene la fórmula:



donde:

-A- es unidad de extensión unida covalentemente a un tío de cisteína del anticuerpo (Ab);

a es 0 ó 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;

-Y- es una unidad espaciadora unida covalentemente al grupo farmacológico; y

y es 0, 1 ó 2.

Unidad de extensión

[0518] La unidad de extensión (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-). En este aspecto, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de un extensor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, ya sea de forma natural o mediante manipulación química, incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales del anticuerpo son sulfhidrilo o amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de un puente disulfuro intramolecular de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reacción de un grupo amino de un grupo lisina de un anticuerpo utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilo. En una realización, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrofílico de una unidad de extensión. Las unidades de extensión de ejemplo en los conjugados de fórmula I se representan en las fórmulas II y II, donde Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se definen anteriormente, y R^{17} es un radical divalente seleccionado entre $(CH_2)_n$ carbociclilo C_3-C_8 , $O-(CH_2)_n$ arileno, $(CH_2)_r$ -arileno, -arileno- $(CH_2)_r$, $(CH_2)_r$ -(carbociclilo C_3-C_8), (carbociclilo C_3-C_8)- $(CH_2)_r$, heterociclilo C_3-C_8 , $(CH_2)_r$ -(heterociclilo C_3-C_8), -(heterociclilo C_3-C_8)- $(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, y $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$; donde R^b es H, alquilo C_1-C_6 , fenilo o bencilo y r es independientemente un número entero que varía de 1 a 10.

[0519] Arileno incluye radicales hidrocarburo aromáticos divalentes de 6-20 átomos de carbono derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema anular aromático. Entre los grupos arileno habituales se incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

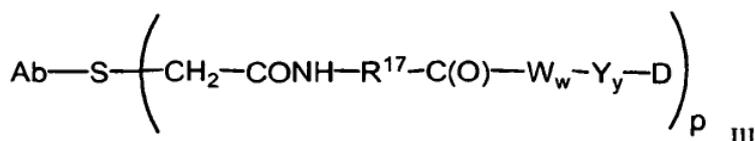
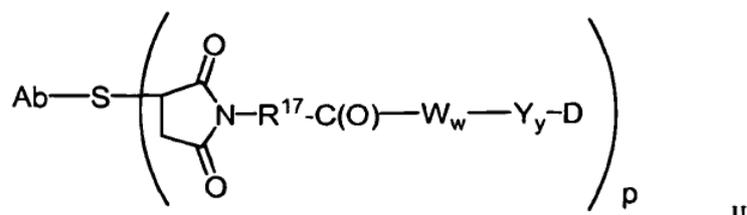
[0520] Los grupos heterociclilo incluyen un sistema anular en que uno o más átomos del anillo son un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3

heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles de Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry de Heterocyclic Compounds, A series de Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta ahora), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

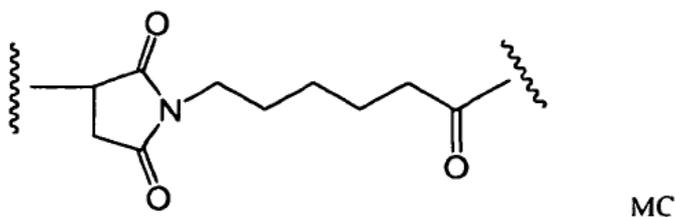
[0521] Ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y sin limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, y isatinoilo.

[0522] Los grupos carbocíclico incluyen un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, aún más habitualmente 5 ó 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o 9 ó 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo, y ciclooctilo.

[0523] Debe entenderse a partir de todas las realizaciones de ejemplo de ADC de fórmula I, tal como II-VI, que incluso cuando no se indica expresamente, de 1 a 4 grupos farmacológicos están unidos a un anticuerpo ($p = 1-4$), dependiendo del número de residuos de cisteína diseñados.

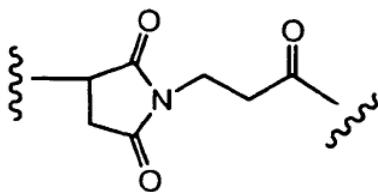


[0524] Una unidad de extensión de fórmula II ilustrativa deriva de maleimido-caproilo (MC) donde R^{17} es $-(\text{CH}_2)_5-$:



[0525] Una unidad de extensión de fórmula II ilustrativa deriva de maleimido-propanoilo (MP) donde R^{17} es $-(\text{CH}_2)_2-$:

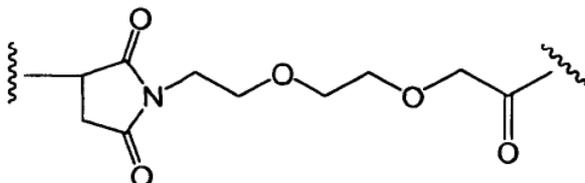
5



MP

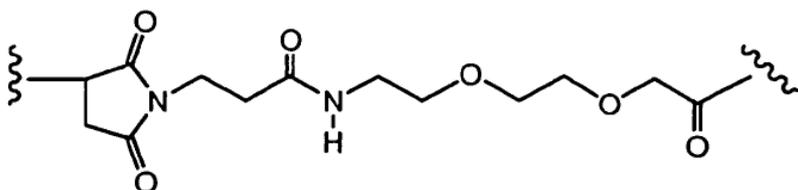
10 [0526] Otra unidad de extensión de fórmula II ilustrativa donde R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y r es 2:

15



20 [0527] Otra unidad de extensión de fórmula II ilustrativa donde R^{17} es $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, donde R^b es H y cada r es 2:

25

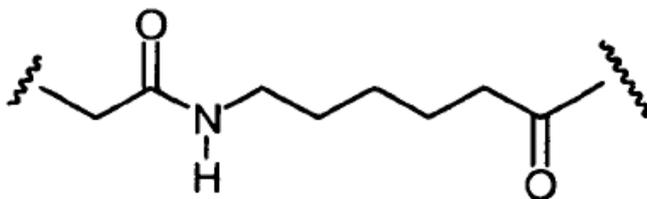


30

MPEG

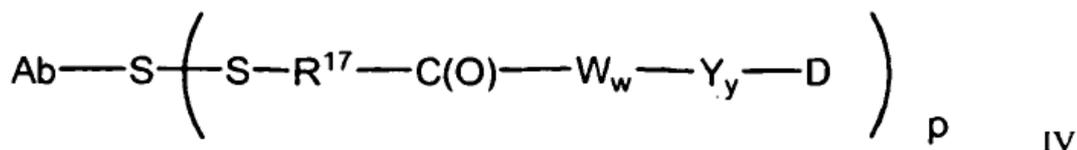
35 [0528] Una unidad de extensión de fórmula III ilustrativa donde R^{17} es $-(CH_2)_5-$:

40



45 [0529] En otra realización, la unidad de extensión está unida al anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas a través de un puente disulfuro entre el átomo de azufre de la cisteína diseñada del anticuerpo y el átomo de azufre de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta realización se representa mediante la fórmula IV, donde R^{17} , $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w y y son tal como se han definido anteriormente.

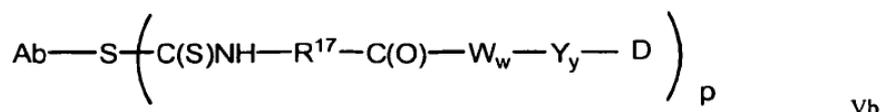
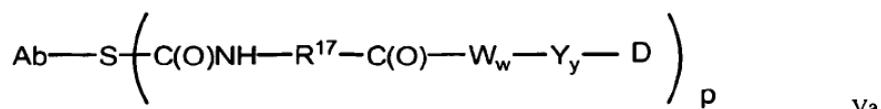
50



55

60 [0530] En otra realización, el grupo reactivo del extensor contiene un grupo funcional reactivo a tiol que puede formar un enlace con un tiol de cisteína libre de un anticuerpo. Ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero sin limitación, maleimida, α -haloacetilo, ésteres activados, tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades extensoras representativas de esta realización se representan por las fórmulas Va y Vb, donde $-R^{17}$, $Ab-$, $-W-$, $-Y-$, $-D$, w y y son tal como se han definido anteriormente;

65

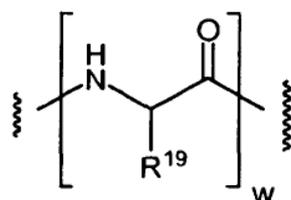


[0531] En otra realización, el enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un grupo farmacológico a través de un grupo enlazador ramificador multifuncional a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar del fármaco con respecto al anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. De este modo, cuando un anticuerpo modificado con cisteínas porta sólo un grupo tiol de cisteína reactivo, se pueden unir una multitud de grupos farmacológicos a través de un enlazador dendrítico.

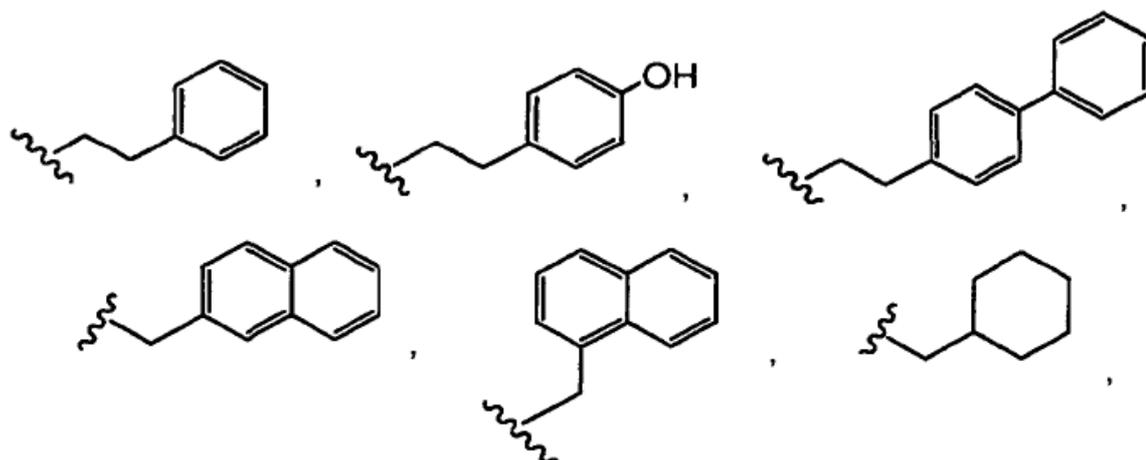
Unidad de aminoácido

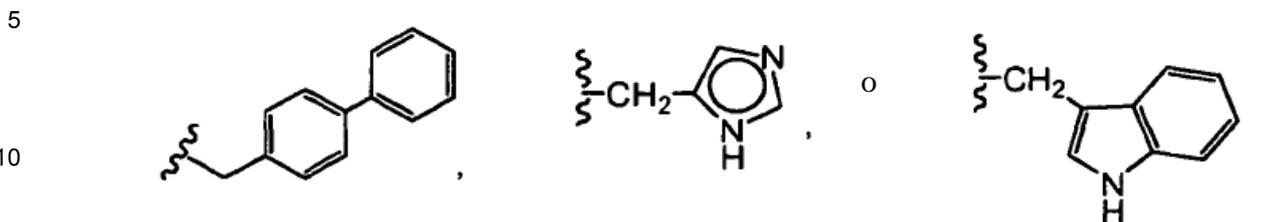
[0532] El enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. La unidad de aminoácido (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) al grupo farmacológico (D) del conjugado de anticuerpo modificado con cisteínas y fármaco (ADC) de la invención.

[0533] -W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácido incluyen aquellos naturales, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Cada unidad de -W- tiene independientemente la fórmula indicada a continuación en corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



donde R¹⁹ es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,





15 **[0534]** Cuando R^{19} es diferente de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^{19} está unido es quiral. Cada átomo de carbono al que R^{19} está unido está independientemente en las configuraciones (S) o (R), o una mezcla racémica. Las unidades de aminoácidos pueden ser por tanto enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

20 **[0535]** Unidades de aminoácidos $-W_w-$ de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácido incluyen los naturales, así como aminoácidos menores y aminoácidos no naturales y análogos, tales como citrulina.

25 **[0536]** La unidad de aminoácido se puede dividir enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a tumor, para liberar el grupo farmacológico (-D) que en una realización está protonada in vivo después de la liberación para proporcionar un Fármaco (D). Los componentes enlazadores de aminoácido se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la separación enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

30 Unidad espaciadora

35 **[0537]** La unidad espaciadora ($-Y_y-$), cuando está presente ($y = 1$ ó 2), une una unidad de aminoácido ($-W_w-$) al grupo farmacológico (D) cuando una unidad de aminoácido está presente ($w = 1-12$). Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad de extensión al grupo farmacológico cuando la unidad de aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también une el grupo farmacológico a la unidad de anticuerpo cuando tanto la unidad de aminoácido y la unidad de extensión están ausentes ($w, y = 0$). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es aquella en que parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al grupo farmacológico después de la separación, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo y fármaco o el grupo enlazador del fármaco. Cuando un ADC que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina experimenta una separación enzimática a través de una proteasa asociada con célula tumoral, una proteasa asociada a célula cancerosa o una proteasa asociada a linfocito, un grupo farmacológico-glicina-glicina o un grupo farmacológico-glicina se separa de $A_b-A_a-W_w-$. En una realización, una reacción de hidrólisis independiente tiene lugar en la célula diana, separando la glicina-grupo farmacológico y liberando el fármaco.

45 **[0538]** En otra realización, $-Y_y-$ es una unidad de p-aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya parte de fenileno está sustituida con Q_m donde Q es alquilo- C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -halógeno,- nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4.

50 **[0539]** Las realizaciones de ejemplo de una unidad espaciadora no autoinmolativa ($-Y-$) son: -Gly-Gly- ; -Gly-; -Ala-Phe- ; -Val-Cit- .

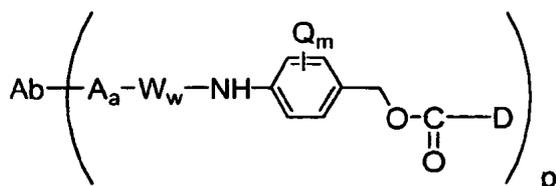
55 **[0540]** En una realización, se proporciona un enlazador de grupo farmacológico o un ADC en que la unidad espaciadora está ausente ($y=0$), o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

60 **[0541]** Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmolativa puede liberar -D. En una realización, $-Y-$ es un grupo PAB que está unido a $-W_w-$ a través del átomo de nitrógeno de amino del grupo PAB, y conectado directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter, donde el ADN tiene la estructura de ejemplo:

65

5

10



15

20

25

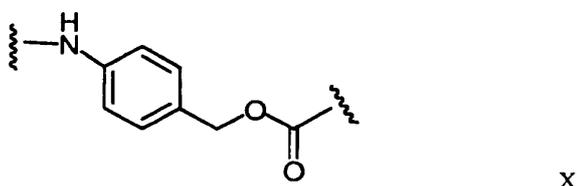
donde Q es alquilo-C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno,- nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p varía de 1 a 4.

[0542] Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), análogos de PAB heterocíclicos (US 2005/0256030), beta-glucurónido (WO 2007/01196R), y orto o para-aminobencilacetales. Los espaciadores que se pueden utilizar experimentan la ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tal como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodríguez et al (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas anulares biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en glicina (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmolativos útiles en ADC.

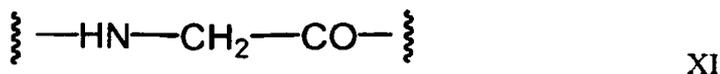
30

[0543] Unidades espaciadores de ejemplo (-Y-) se representan por las fórmulas X-II:

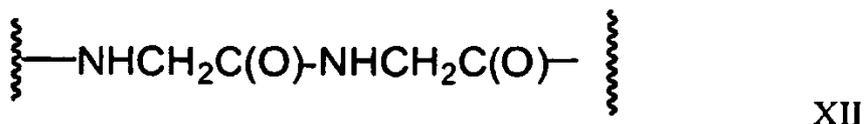
35



40



45



50

Enlazadores dendríticos

55

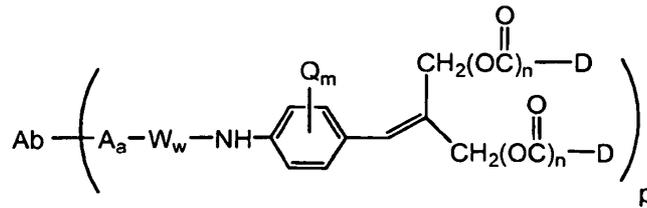
60

[0544] En otra realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un grupo farmacológico a través de un grupo enlazador multifuncional ramificante a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. De este modo, cuando un anticuerpo modificado con cisteínas porta sólo un grupo tiol de cisteína reactivo, se puede unir una multitud de grupos farmacológicos a través de un enlace dendrítico. Las realizaciones de ejemplo de enlazadores dendríticos ramificados incluyen unidades de dendrímeros de 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4494-4499).

65

[0545] En una realización, la unidad espaciadora es un bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificado, que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tienen la estructura:

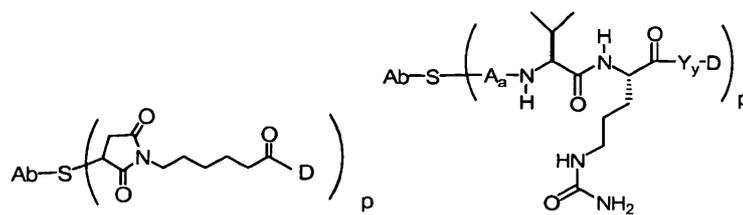
5



10 que comprende una unidad de dendrímero 2-(4-aminobencilideno)propano-1,3-diol (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), donde Q es alquilo-C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno,- nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; n es 0 ó 1; y p varía de 1 a 4

15 **[0546]** Realizaciones de ejemplo de compuestos conjugados de anticuerpo y fármaco de fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (valcit), XIIIc (MC-val-cit), y XIId (MC-val-cit-PAB):

20

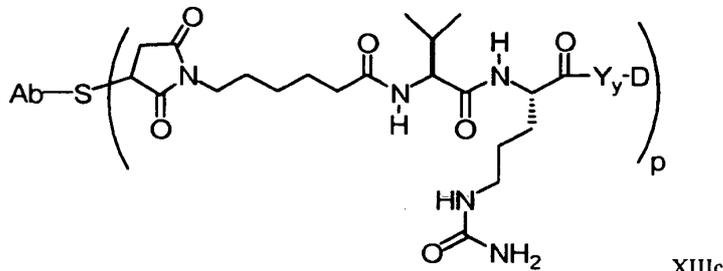


25

XIIIa

XIIIb

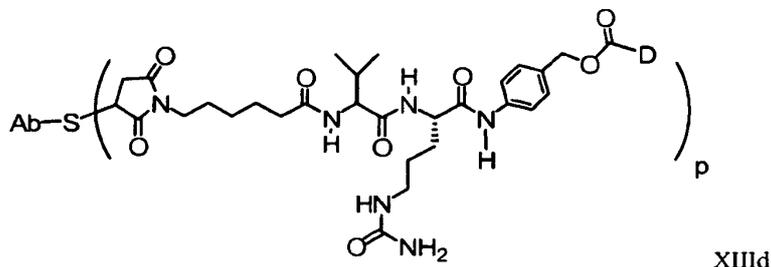
30



40

XIIIc

45



50

XIIId

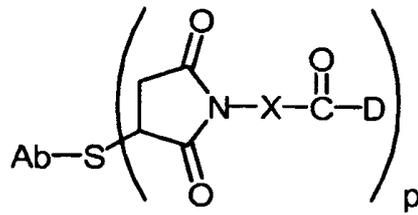
55

[0547] Otras realizaciones de ejemplo de los compuestos de conjugados de anticuerpo y fármaco de fórmula Ia incluyen XIVa-e:

60

65

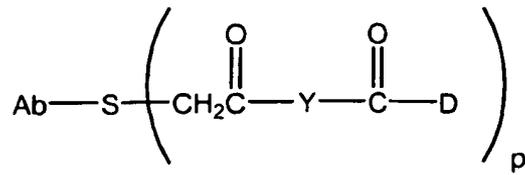
5



XIVa

10

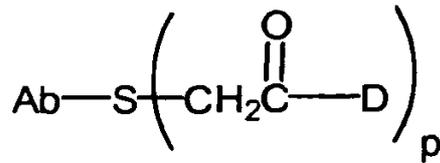
15



XIVb

20

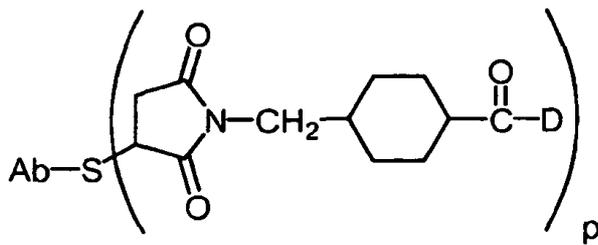
25



XIVc

30

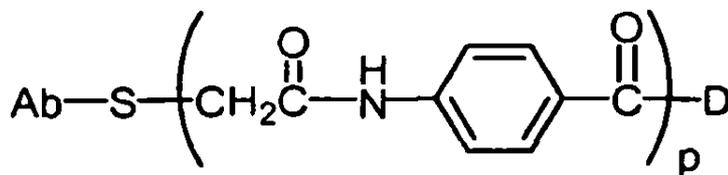
35



XIVd

40

45



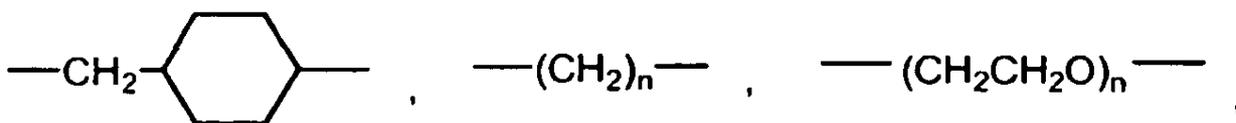
XIVe

50

55

donde X es:

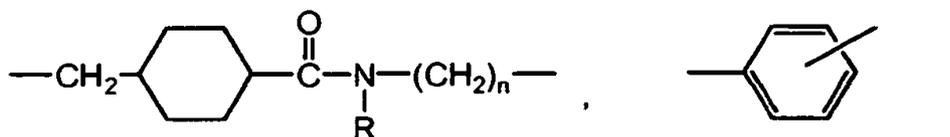
60



65

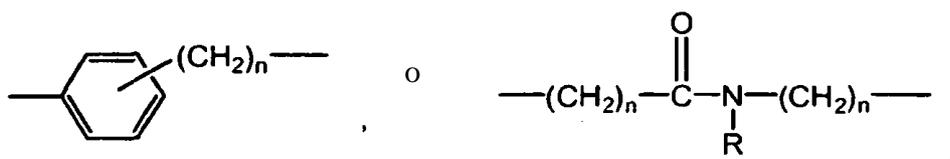
5

10



15

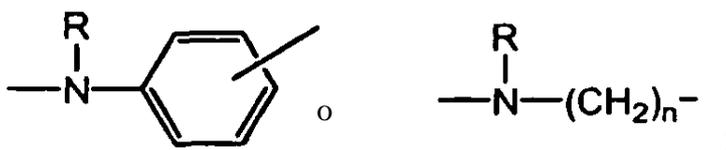
20



Y es:

25

30

y R es independientemente H o alquilo C₁-C₆; y n es 1 a 12.

35

[0548] En otra realización, un enlazador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleofílico que es reactivo a un grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrofílico en un anticuerpo y forma un enlace covalente a una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleofílicos útiles en un enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazina, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

40

45

[0549] Habitualmente, los enlazadores de tipo péptido se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pag 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los intermedios enlazadores se pueden ensamblar con cualquier combinación o secuencia de reacciones que incluyen unidades de espaciadores, de extensión y aminoácidos. Las unidades de espaciadores, de extensión y aminoácidos pueden utilizar grupos funcionales reactivos que son electrofílicos, nucleofílicos o radicales libres en la naturaleza. Los grupos funcionales reactivos incluyen, pero sin limitación, grupos carboxilo, hidroxilo, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y salientes, tales como O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br, -I; o maleimida.

50

55

[0550] Por ejemplo, un sustituyente cargado, tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio, puede incrementar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo o el grupo farmacológico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (intermedio enlazador de anticuerpo) con D, o D-L (intermedio enlazador de fármaco) con Ab dependiendo de la ruta sintética utilizada para preparar el ADC.

Reactivos enlazadores

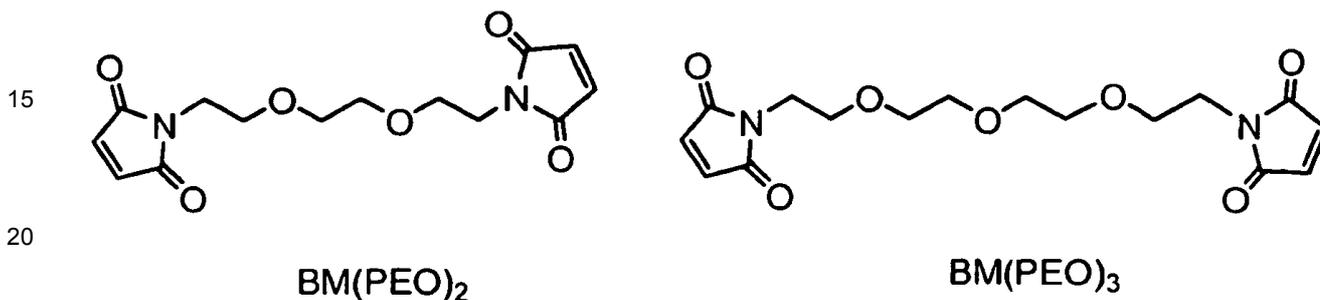
60

[0551] Los conjugados del anticuerpo y auristatina se pueden producir utilizando una variedad de reactivos enlazadores bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

65

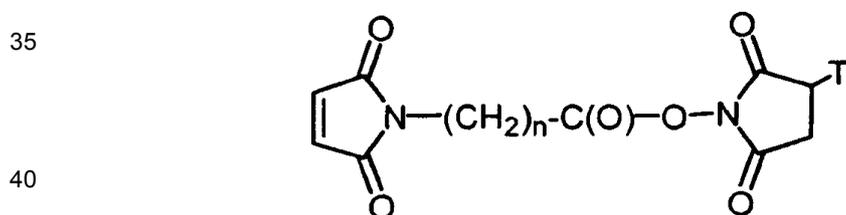
[0552] Los conjugados de anticuerpo y fármaco también se pueden preparar con reactivos enlazadores: BMPEO,

5 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), y que incluyen reactivos de bis-maleimida, DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietilenglicol (BM(PEO)₂), y 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol (BM(PEO)₃), que están disponibles comercialmente de Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, y otros suministradores de reactivos. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol a un anticuerpo modificado con cisteínas a un grupo farmacológico que
10 contiene tiol, marcador o intermedio enlazador, de una manera secuencial o simultánea. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo modificado con cisteínas, grupo farmacológico, marcador, o intermedio enlazador incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.

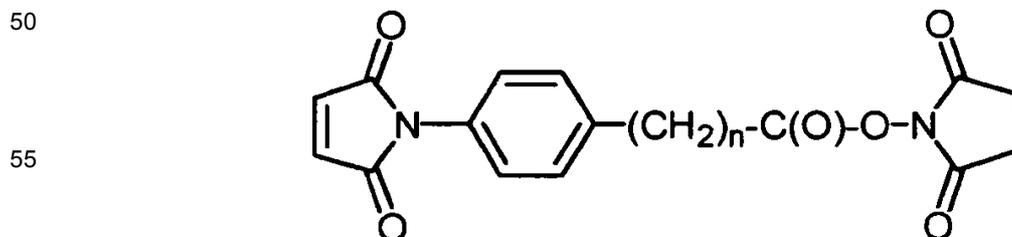


25 **[0553]** Los reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse según procedimientos descritos en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; and WO 04/032828.

30 **[0554]** Los extensores de fórmula (IIIa) se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos enlazadores con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácido:



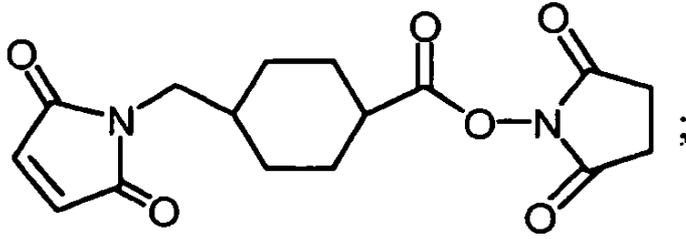
45 donde n es un número entero que varía de 1-10 y T es -H o -SO₃Na;



60 donde n es un número entero que varía de 0-3;

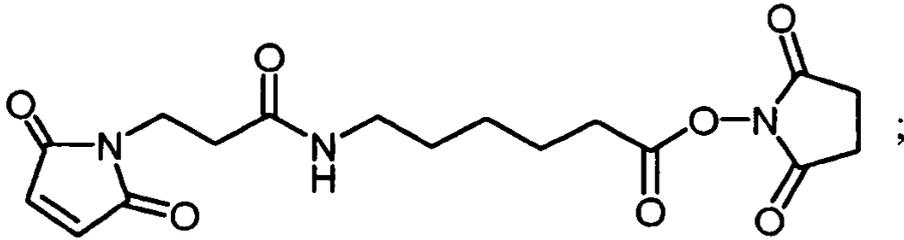
65

5



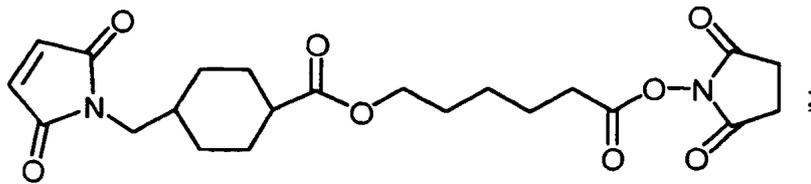
10

15



20

25

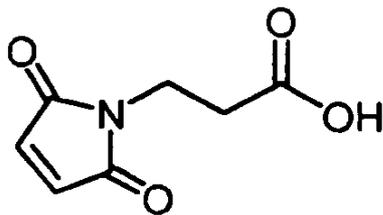


30

35

y

40

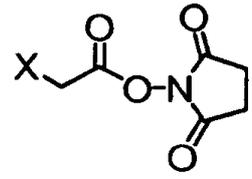
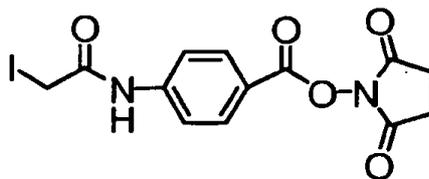
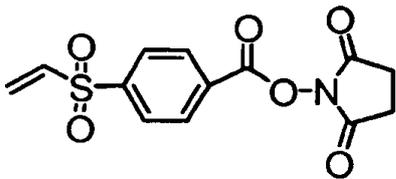


45

50

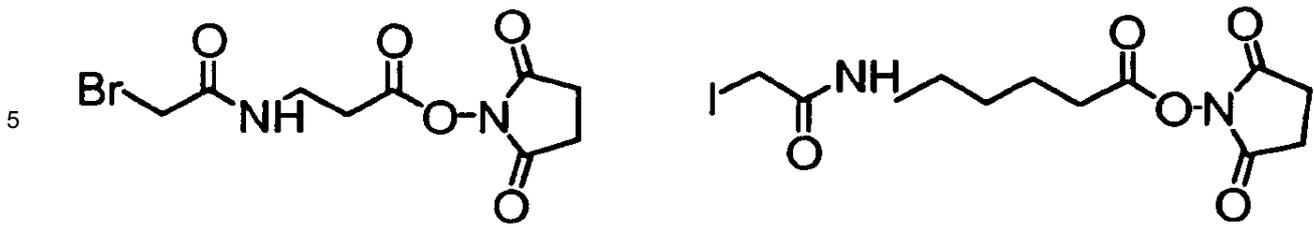
[0555] Las unidades de extensión se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácido:

55



60

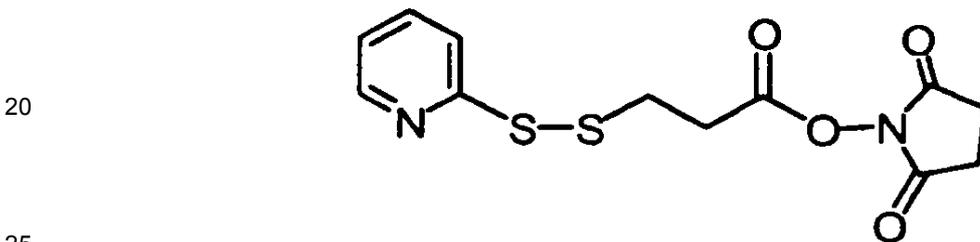
65



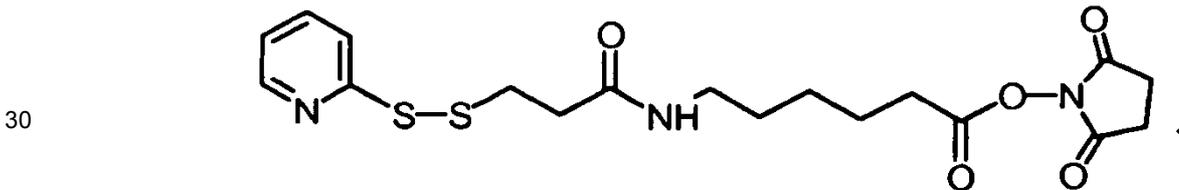
10

donde X es Br o I.

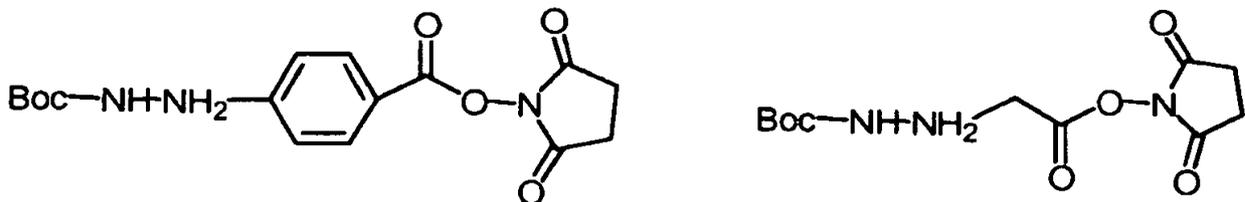
15 **[0556]** Las unidades de extensión de fórmula se pueden introducir en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos funcionales con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácido:



25



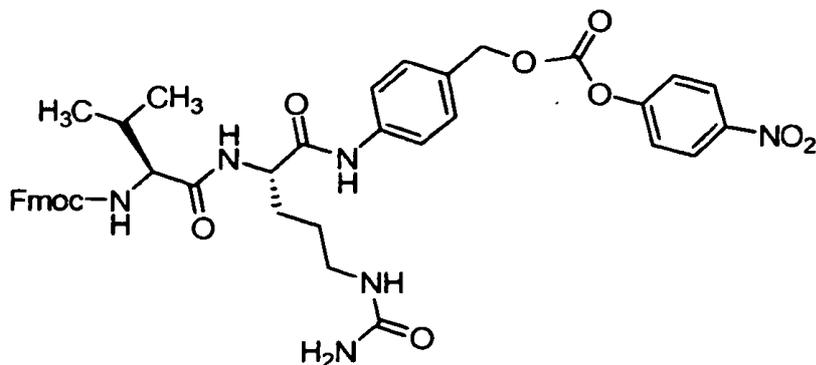
35



45

[0557] Un ejemplo de reactivo enlazador de dipéptido valina-citrulina (val-cit o vc) que tiene un extensor de maleimida y un espaciador autoinmolativo de paraaminobencilcarbamoilo (PAB) tiene la estructura:

50

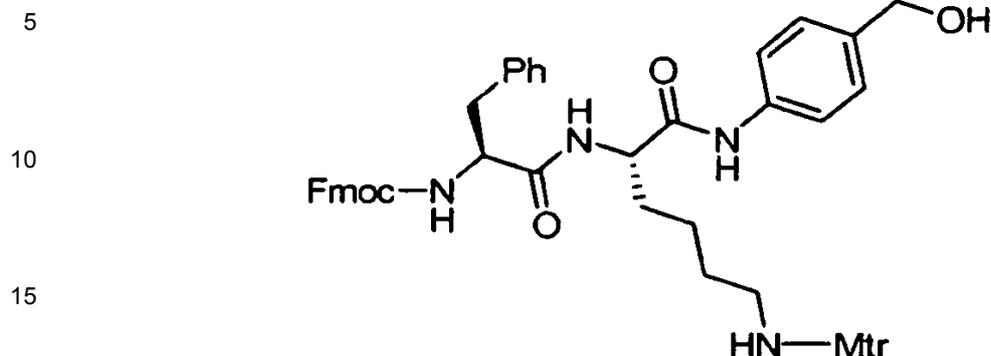


60

[0558] Un ejemplo de reactivo enlazador de dipéptido de phe-lys (Mtr, mono-4-metoxitritilo) que tiene una unidad de extensión de maleimida y una unidad espaciadora autoinmolativa PAB se puede preparar según Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60, y tiene la estructura:

65

65



25

Preparación de conjugados de fármacos y anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas

25 **[0559]** El ADC de fórmula I se puede preparar mediante varias rutas que utilizan reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo cisteína de un anticuerpo modificado con cisteínas con un reactivo enlazador para formar un intermedio enlazador de anticuerpo Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo farmacológico activado D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador para formar un intermedio enlazador de fármaco D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo cisteína de un anticuerpo modificado con cisteínas. Los métodos de conjugación (1) y (2) se pueden utilizar con una variedad de anticuerpos modificados con cisteínas, grupos farmacológicos, y enlazadores para preparar los conjugados de anticuerpo y fármacos de Fórmula I.

35 **[0560]** Los grupos tioles de cisteína de anticuerpos son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en reactivos enlazadores e intermedios enlazadores de fármacos que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBT, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo, y maleimida; y (iv) disulfuros, incluyendo disulfuros de piridilo, a través del intercambio de puentes disulfuro. Los grupos nucleofílicos en un grupo farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazina, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en grupos enlazadores y reactivos enlazadores.

45 **[0561]** Los anticuerpos modificados con cisteínas pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de la reoxidación para volver a formar enlaces disulfuro intercadenas e intracadenas (ejemplo 5). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales modificados con cisteína de longitud completa (TioMabs) expresados en células CHO se reducen con un exceso molar de aproximadamente 50 veces de TCEP durante 3 horas a 37°C para reducir los enlaces disulfuro en aductos de cisteína que se pueden formar entre los residuos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo. El TioMab reducido se diluye y carga en una columna HiTrap S en acetato de sodio 10 mM, pH 5 y se eluye con PBS que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Los enlaces disulfuro se restablecieron entre residuos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre acuoso (CuSO₄) (200 nM) diluido a temperatura ambiente, durante la noche. Alternativamente, el ácido deshidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos disulfuro intracadenas del anticuerpo modificado con cisteínas después de la separación reductora de los aductos de cisteína. Se pueden utilizar otros oxidantes, es decir agentes oxidantes, y condiciones oxidantes, que son conocidas en la técnica. La oxidación con aire del ambiente también es eficaz. Esta etapa de reoxidación parcial suave forma enlaces disulfuro intracadenas de manera eficaz con una fidelidad elevada y mantiene los grupos tiol de los residuos de cisteína recién introducidos. Se añadió un exceso de aproximadamente 10 veces de intermedio enlazador de fármaco, por ejemplo, MC-vc-PAB-MMAE, se mezcló y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para realizar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y eluyó a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso de intermedio enlazador de fármaco y otras impurezas.

65 **[0562]** La figura 16 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo modificado con cisteínas expresado a partir del cultivo celular para la conjugación. Cuando el medio del cultivo celular contiene cisteína, se pueden formar

aductos de disulfuro entre el aminoácido de cisteína recién introducido y la cisteína del medio. Estos aductos de cisteína, representados como un círculo en el TioMab de ejemplo (izquierda) en la figura 16, deben reducirse para generar anticuerpos modificados con cisteínas reactivas para la conjugación. Los aductos de cisteína, presumiblemente junto con enlaces disulfuro intercadenas, se separan de forma reductora para producir una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores, tales como TCEP. Los enlaces disulfuro intercadenas entre los residuos de cisteína emparejados se vuelven a formar bajo condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o la exposición a oxígeno ambiente. Los residuos de cisteína recién introducidos, diseñados y emparejados permanecen disponibles para la reacción con reactivos enlazadores o intermedios enlazadores de fármacos para formar los conjugados de anticuerpo de la invención. Los TioMab expresados en líneas celulares de mamífero dan lugar a aductos de Cys conjugados externamente a una formación de enlaces -S-S- a través de Cys diseñada. Por tanto, los TioMabs purificados se tratan con los procedimientos de reducción y reoxidación tal como se describe en el ejemplo 5 para producir TioMabs reactivos. Estos TioMabs se utilizan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimida, fluoróforos y otros marcadores.

10. Inmunoliposomas

[0563] Los anticuerpos anti-CD79b descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

[0564] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente solicitud se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. En el liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

B. Algunos métodos de producción de anticuerpos

I. Cribado de anticuerpos anti-CD79b con las propiedades deseadas

[0565] Las técnicas para generar anticuerpos que se unen a polipéptidos CD79b se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

[0566] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-CD79b de la invención se pueden valorar mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando células que expresan un polipéptido CD79b endógenamente o tras la transfección con el gen de CD79b. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con CD79b apropiadas se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-CD79b de la invención a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CD79b de la invención. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN cuantificada en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. La célula tumoral puede ser la que sobreexpresa un polipéptido CD79b. El anticuerpo anti-CD79b inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa CD79b *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25-100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100%, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100% ó 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-CD79b de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la reducción de la proliferación del tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

[0567] Para seleccionar un anticuerpo anti-CD79b que induce la muerte celular, se pueden evaluar la pérdida de

integridad de la membrana indicada mediante, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido CD79b se incuban con medio solo o medio que contiene el anticuerpo anti-CD79b apropiado (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml). Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se fraccionan en tubos 12x 75 de tapón colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la extracción de grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti-CD79b que inducen estadísticamente niveles significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-CD79b inductores de la muerte celular.

[0568] Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo en un polipéptido CD79b unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-CD79b conocido. Alternativa o adicionalmente, la localización del epítipo se realiza mediante métodos conocidos en el sector. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar mediante, por ejemplo, rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por su unión con anticuerpo policlonal para asegurar el pliegue correcto. En un método diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido CD79b en ensayos de competición con los anticuerpos de análisis o con un anticuerpo de análisis y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

2. Algunos métodos de cribado de bibliotecas

[0569] Los anticuerpos anti-CD79b de la presente invención se pueden fabricar utilizando bibliotecas combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica varios métodos para generar bibliotecas de expresión en fagos y cribar dichas bibliotecas por anticuerpos que poseen las características de unión deseada. Dichos métodos se describen en general en Hoogenboom et al. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas realizaciones, en Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

[0570] En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen el fago que expresa varios fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, de este modo, se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen a continuación del antígeno y se pueden enriquecer posteriormente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b de la presente invención se pueden obtener mediante el diseño de un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-CD79b de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0571] En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de la cadena ligera (VL) y otra de la pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en los fagos, por ejemplo, como fragmentos de una sola cadena Fv (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interacciona de forma no covalente, tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Tal como se utiliza aquí, los clones de fagos que codifican scfv y los clones de fagos que codifican Fab se refieren colectivamente como "clones de fagos de Fv" o "clones de Fv".

[0572] Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse separadamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, y a continuación se puede realizar la búsqueda de clones de unión al antígeno tal como se describió por Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratar puede clonarse para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos en un intervalo amplio de antígenos no propios y también de propios sin ninguna inmunización tal como se describió por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratar también se pueden fabricar sintéticamente mediante la clonación de los segmentos del gen V no reordenados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y realizar el reordenamiento *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992);

[0573] En ciertas realizaciones, el fago filamentoso se utiliza para expresar fragmentos de anticuerpos mediante fusión con la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden expresarse como fragmentos Fv de una sola cadena, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); o como fragmentos Fab, en los que se fusiona una cadena a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblamiento de una estructura Fab-proteína de recubrimiento se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo salvaje, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., Nucl. Acids. Res., 19:4133-4137 (1991).

[0574] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo se obtiene de células inmunes recogidas de humanos o animales. Si se desea una biblioteca predispuesta a favor de clones anti-CD79b, el sujeto se inmuniza con CD79b para generar una respuesta de anticuerpo, y se recuperan células de bazo y/o células B circulantes diferentes de linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos predispuesto a favor de clones anti-CD79b mediante la generación de una respuesta de anticuerpo anti-CD79b en ratones transgénicos que portan un grupo de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de manera que la inmunización con CD79b produce células B que producen anticuerpos humanos contra CD79b. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

[0575] El enriquecimiento adicional para poblaciones de células reactivas anti-CD79b se puede obtener utilizando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de CD79b, por ejemplo, mediante separación celular utilizando cromatografía de afinidad de CD79b o adsorción de células a CD79b marcada con fluorocromo seguido de la clasificación celular activada por flujo (FACS).

[0576] Alternativamente, la utilización de células del bazo y/o células B o de otros PBLs de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpos posibles y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humana o no humana) en que CD79b no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se recogen las células madre del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunes de interés pueden obtenerse de diversas especies animales, como humano, ratón, rata, lagomorfos, luprinos, canino, felino, porcino, bovino, equino y especies aves, etc.

[0577] El ácido nucleico que codifica segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse mediante aislamiento de ADN genómico o del mRNA de linfocitos seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se hibridan con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados, tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), produciendo así repertorios de genes V diversos para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir del ADNc y de ADN genómico, con cebadores de sentido 3' de transcripción en el extremo 5' del exón codificante del dominio V maduro y cebadores de sentido 5' de transcripción basados en el segmento J, tal como se describe en Orlandi et al., *supra* y en Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores de sentido 3' de transcripción también pueden basarse en el exón líder tal como se describe en Jones et al., Biotechnol. 9:88-89 (1991), y los cebadores de sentido 5' de transcripción en la región constante tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores tal como se describe en Orlandi et al., *supra*, o Sastry et al., *supra*. En ciertas realizaciones, se maximiza la diversidad de bibliotecas mediante la utilización de cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V con el fin de amplificar todos los reordenamientos de VH y VL disponibles en la muestra de ácido nucleico de células inmunes, por ejemplo, tal como se describe en el procedimiento de Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o como se describe en el procedimiento de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducirse dianas de restricción raras dentro de los cebadores de PCR como una etiqueta en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al., *supra*, o mediante amplificación por PCR posterior con un cebador etiquetado tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

[0578] Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de segmentos de genes-VH humanos se han clonado y secuenciado (publicado por Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)) y se han localizado (publicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden utilizarse para generar repertorios de genes VH diversos con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencias y longitudes varias, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden fabricarse con toda la diversidad de secuencia focalizada en un bucle de H3 largo de una longitud única, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). También se han clonado y secuenciado segmentos V κ y V λ humanos (publicado por Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para fabricar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un grupo de pliegues de VH y VL, y de longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos

de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADNs que codifican genes V, se pueden reordenar segmentos de genes V de la línea germinal *in vitro* de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

5 [0579] Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios de genes VH y VL juntos de muy diversas maneras. Cada repertorio puede crearse en vectores distintos, y los vectores pueden combinarse *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* explota la naturaleza de dos cadenas de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratar se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fagos. Las dos bibliotecas se combinan entonces mediante infección fágica de las bacterias que contienen el fagémido, de modo que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca se limita únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un único replicón y se co-empaquetan en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan un gran número de anticuerpos diversos de buena afinidad (Kd^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

20 [0580] Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos mediante PCR y luego clonarse, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). El ensamblaje por PCR puede también utilizarse para unir ADNs de VH y VL con el ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de una sola cadena (scFv). En otra técnica, "el ensamblamiento por PCR en la célula" se utiliza para combinar los genes de VH y VL en los linfocitos mediante PCR y luego clonar los genes unidos, tal como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids. Res. 20:3831-3837 (1992).

30 [0581] Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratar (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (kd^{-1} de aproximadamente 10^6 a $10^7 M^{-1}$), pero la maduración para afinidad puede también ser simulada *in vitro* mediante la construcción y reselección a partir de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación puede introducirse aleatoriamente *in vitro* utilizando una polimerasa propensa a errores (publicada en Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración para afinidad puede realizarse mutando aleatoriamente una o más CDRs, por ejemplo, utilizando la PCR con cebadores que contienen una secuencia aleatoria que comprende la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y el posterior cribado de clones de mayor afinidad. La WO 96/07754 (publicada el 14 de marzo de 1996) describe un procedimiento para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia efectiva es recombinar los dominios VH y VL seleccionados mediante expresión en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidos de donantes no inmunizados y el cribado de una mayor afinidad en diversas rondas de rebarajado de cadenas, tal como se describe en Marks col., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

45 [0582] El cribado de las bibliotecas se puede realizar mediante varias técnicas conocidas en el sector. Por ejemplo, CD79b puede utilizarse para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en células huésped fijadas a placas de adsorción o utilizarse en la clasificación celular, o conjugarse a biotina para la captura con partículas recubiertas con estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro método para cribar bibliotecas de expresión en fagos.

50 [0583] Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con CD79b inmovilizado bajo condiciones adecuadas para unirse a por lo menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se selecciona para mimetizar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen por ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo tal como se describe en Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competición con antígeno de CD79b, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden desarrollar en cultivos bacterianos y someterse a rondas posteriores de selección.

60 [0584] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si los múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden estar captados simultáneamente por el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débil) se pueden mantener mediante la utilización de lavados cortos, expresión en fagos multivalentes y densidad de recubrimiento elevada del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la unión de nuevo del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con una cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede inducir mediante la utilización de lavados largos y la

65

expresión en fagos monovalentes tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de recubrimiento baja de antígeno tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

5 **[0585]** Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para CD79b. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, realizada en algunas técnicas de maduración para afinidad) produzca muchos mutantes, la mayoría se unen al antígeno y unos pocos con mayor afinidad. Con la limitación de CD79b, se podría descartar fagos raros de afinidad elevada. Para mantener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con un exceso de CD79b biotinilado, pero con el CD79b biotinilado a una concentración de molaridad inferior a la constante de afinidad molar de la diana para CD79b. Los fagos de unión de afinidad elevada se pueden capturar a continuación mediante partículas paramagnéticas recubiertas por estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad más elevada de como mínimo dos veces a partir de una gran exceso de fagos con una afinidad inferior. Las condiciones utilizadas en fagos de lavado unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en base a la cinética de disociación.

20 **[0586]** Los clones anti-CD79b se pueden seleccionar en base a la actividad. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que se unen a células vivas que expresan CD79b de forma natural. En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que bloquean la unión entre un ligando de CD79b y CD79b, pero no bloquean la unión entre un ligando de CD79b y una segunda proteína. Los clones de Fc correspondientes a dichos anticuerpos anti-CD79b se pueden seleccionar mediante (1) el aislamiento de clones anti-CD79b de una biblioteca de fagos tal como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente la amplificación de la población aislada de clones de fagos mediante el crecimiento de la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) la selección de CD79b y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorción de los clones de fagos anti-CD79b a CD79b inmovilizado; (4) utilización de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconoce los determinantes de unión a CD79b que se solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseados se pueden enriquecer adicionalmente mediante la repetición una o más veces de los procedimientos de selección descritos aquí.

35 **[0587]** El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv que se expresan en fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de hibridoma o plantilla de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, y luego transfectarse en células huésped como por ejemplo *E. coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN codificante del anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthum, *Immunol Revs.* 130:151-188 (1992).

45 **[0588]** El ADN que codifica los clones de Fv de la presente invención se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constante de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, se pueden obtener secuencias de ADN apropiadas de Kabat et al., supra) para formar clones que codifican cadenas pesada y/o ligera de longitud completa o parcial. Se entenderá que para este objetivo se pueden utilizar las regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como humano) y a continuación y que a continuación se fusiona a ADN de región constante de otra especie animal para formar una secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera "híbridas" de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" tal como se utiliza aquí. En ciertas realizaciones, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de región constante humano para formar la secuencia o secuencias codificantes para las cadenas pesada y/o ligera humana de longitud completa o parcial.

60 **[0589]** El ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b derivado de un hibridoma de la presente invención también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv se pueden modificar adicionalmente mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no era inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tengan la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma de la presente invención.

C. Terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT)

[0590] Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

[0591] El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

[0592] Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se pueden utilizar para convertir los profármacos de la solicitud en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación de la abzima a una población de células tumorales.

[0593] Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-CD79b mediante técnicas bien conocidas en el sector, tales como la utilización de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608 (1984)).

D. Anticuerpo anti-CD79b

[0594] Además de los anticuerpos anti-CD79b descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpo anti-CD79b. Las variantes de anticuerpo anti-CD79b se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del polipéptido o anticuerpo deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-CD79b, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

[0595] Las variaciones en los anticuerpos anti-CD79b descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o el polipéptido que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-CD79b. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del anticuerpo anti-CD79b con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tienen una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0596] En la presente invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo anti-CD79b. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-CD79b.

[0597] Los fragmentos del anticuerpo anti-CD79b se pueden preparar mediante cualquiera de un conjunto de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque

alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores de los extremos 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo anti-CD79b comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-CD79b nativo descrito aquí.

[0598] En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 8 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones", en la Tabla 8 o tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

15 **Tabla 8**

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (U)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly(G)	Ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	Trp; leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0599] Las modificaciones sustanciales en la unión o identidad inmunológica del anticuerpo ant-CD79b se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0600] Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservativos).

[0601] Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante del anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., *Nucl. Acids. Res.*, **13**: 4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids. Res.*, **10**: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., *Gene*, **34** 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, **317**:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

[0602] El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es

habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

[0603] También se puede sustituir, generalmente por serina, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-CD79b para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo anti-CD79b para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

[0604] Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido CD79b humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

[0605] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD79b se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-CD79b.

E. Modificaciones de anticuerpos anti-CD79b

[0606] Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-CD79b se incluyen en el alcance de la invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un anticuerpo anti-CD79b con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del anticuerpo anti-CD79b. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo anti-CD79b con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-CD79b, y viceversa. Entre los agentes entrecruzadores utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0607] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0608] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-CD79b incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en anticuerpo anti-CD79b de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-CD79b de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

[0609] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0610] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-CD79b se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-CD79b original (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD79b puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0611] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el anticuerpo anti-CD79b es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

[0612] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-CD79b se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, et. al. Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge, et al. Anal. Biochem., 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura et al. Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

[0613] Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-CD79b comprende la unión del anticuerpo a uno del conjunto de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. El anticuerpo puede también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización de interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato) respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

[0614] El anticuerpo anti-CD79b también se puede modificar de una manera que forme moléculas quiméricas que comprende un anticuerpo anti-CD79b fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

[0615] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-CD79b con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-CD79b. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas del anticuerpo anti-CD79b se puede detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el anticuerpo anti-CD79b se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

[0616] En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-CD79b con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o

inactivado) de un anticuerpo anti-CD79b en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH₂ y CH₃, o la bisagra, regiones CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

5

F. Preparación de anticuerpos anti-CD79b

[0617] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-CD79b mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar los anticuerpos anti-CD79b. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varias partes del anticuerpo anti-CD79b y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-CD79b deseado.

I. Aislamiento de ADN que codifica anticuerpo anti-CD79b

[0618] El ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-CD79b y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-CD79b humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante métodos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

[0619] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0620] Las técnicas que describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son bien conocidas. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la rigurosidad moderada y la rigurosidad elevada, se proporcionan en Sambrook et al., *supra*.

[0621] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención.

[0622] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores y procesando intermedios de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0623] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del anticuerpo anti-Cd79b y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*.

[0624] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas, que significa la introducción de ADN en el huésped de manera que el ADN es replicable, ya sea como integrante extracromosómico como cromosómico, son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas, polietilenglicol/DMSO y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., supra, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0625] Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente invención incluyen células procariotas, levadura o eucariotas superiores.

a. Células huésped procariotas

[0626] Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero sin limitación, arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. Coli*. Varias cepas de *E. Coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. Coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. Coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. Coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. Coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. Coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. Coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. Coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina, la cepa de *E. Coli* W3110 33D3 que tiene el genotipo W3110 *AfhuA (ΔtonA) ptr3 lac lq lacL8 ΔompTΔ (nmpc-fepE) degP41 kan^r* (patente de Estados Unidos No. 5,639,635) y una cepa de *E. Coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* □□1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308(ATCC 31,608) también son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden utilizar de forma adecuada como huésped especies de *E. Coli*, *Serratia* o *Salmonella* cuando se utilizan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Habitualmente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de manera deseable inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

[0627] El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocóncugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa presentan una vida media mayor en la circulación. La producción en *E. Coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5,648,237 (Carter et. al.), la Patente de Estados Unidos 5,789,199 (Joly et al.), y la Patente de Estados Unidos 5,840,523 (Simmons et al.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, estas patentes incorporadas aquí por referencia. Después de la expresión, se aísla el

anticuerpo de la pasta celular de E: coli en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado en, por ejemplo, células CHO.

5 b. Células huésped eucariotas

[0628] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recai* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilbum et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

[0629] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-CD79b glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0630] Sin embargo, el mayor interés ha estado en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0631] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-CD79b y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

55 3. Selección y utilización de un vector replicable

[0632] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que lo codifica es aislado e insertado en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped a utilizar. En general, las células huéspedes preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero).

[0633] El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN

se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

[0634] El polipéptido CD79b se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de glucoamilasa de *C. Albicans* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes secretoras virales.

a. Células huésped procarionotas

[0635] Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la presente invención se pueden obtener utilizando técnicas de recombinación estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez obtenidos, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarionotas. Existen muchos vectores disponibles y conocidos en la técnica que se pueden utilizar para el objetivo de la presente invención. La selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogo, o ambos) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside.

[0636] En general, los vectores de plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas, así como secuencias marcadores que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. Dicha secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 que contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas, es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativa, el origen de plásmido 2μ es adecuado para levadura, y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. pBR322, sus derivados, o u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o ser modificados para contener, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., Patente de estados Unidos No. 5,648,237.

[0637] Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como λ GEM.TM.-11 en la fabricación de un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células huéspedes susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

[0638] El vector de expresión de la presente invención puede comprender dos o más parejas promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto al cistrón que modula su expresión. Los promotores procarionotas se clasifican normalmente en dos clases, inducible y constitutivo. El promotor inducible es un promotor que inicia mayores niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

[0639] Se conoce una gran cantidad de promotores reconocidos por una serie de células huésped potenciales. El promotor seleccionado se puede unir operativamente a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la extracción del promotor del ADN de origen a través de la digestión con enzima de restricción y la inserción de la secuencia del promotor aislada en el vector de la presente invención. Se pueden utilizar tanto la secuencia del promotor nativo como de promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los

genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

5 **[0640]** Los promotores reconocidos por un conjunto de potenciales células huésped son bien conocidos. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas de promotores de la β -galactamasa y lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotores de triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776] y promotores híbridos, tales como el promotor tac tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] o el promotor trc. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica un anticuerpo anti-CD79b. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en las bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo así a un técnico unirlas a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

10 **[0641]** En un aspecto de la presente invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de la presente invención debería ser aquella que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II (STII) estable al calor, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la presente invención, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de la misma.

20 **[0642]** En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la presente invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped, y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistrón. En este aspecto, se expresan las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas trxB de E. coli) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo así el pliegue y ensamblaje correctos de subunidades de proteínas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

30 **[0643]** La presente invención proporciona un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de los componentes del polipéptido expresado se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y correctamente ensamblados de la invención. Dicha modulación se lleva a cabo por lo menos en parte mediante la modulación simultánea de fuerzas traduccionales para los componentes del polipéptido.

40 **[0644]** Una técnica para modular la fuerza traduccional se describe en Simmons et al., Patente de Estados Unidos. No. 5,840,523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) en un cistrón. Para una TIR determinada, se puede crear una serie de variantes de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando así un medio conveniente por el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan lugar a cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de las secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" en el inicio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir mediante el cambio de la tercera posición de nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la fabricación del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

55 **[0645]** Preferiblemente, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas TIR para cada cistrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR se pueden determinar mediante la cuantificación del nivel de expresión de un gen informador tal como se describe en detalle en Simmons et al. Patente de Estados Unidos No. 5, 840,523. En base a la comparación de la fuerza traduccional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vectores de expresión de la presente invención.

60 b. Células hésped eucariotas

65 **[0646]** Entre los componentes del vector se incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los

siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(1) *Componente secuencia señal*

5 [0647] Un vector para usar en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es la que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamíferos, se disponen las
10 secuencias señal de mamíferos, así como las secuencias líderes secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

[0648] El ADN para dicha región de precursor está ligada en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo.

15 (2) *Origen de replicación*

[0649] Generalmente, no es necesario un componente origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

20 (3) *Componente de gen de selección*

[0650] Los vectores de expresión y clonación contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a
25 antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0651] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que
30 confiere resistencia al fármaco y sobreviven de esta manera al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0652] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b, tal como
35 DHFR o timidina quinasa, metalotioneina-I y II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096), preparada y propagada tal como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican primero mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de
40 cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicósido, por
45 ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase Patente de Estados Unidos No. 4,965,199.

[0653] Un gen de selección adecuado para utilizar en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de
50 la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

(4) *Componente promotor*

[0654] Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la
55 secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de potenciales células huésped son conocidos.

[0655] Prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases
60 en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

[0656] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para utilizar con huéspedes de levadura incluyen los
65 promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas

glucolíticas [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucoso-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

[0657] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión de levadura se describen adicionalmente en EP 73,657.

[0658] La transcripción de anticuerpos anti-CD79b de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polio, virus de viruela aviar (UK 2,211,504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0659] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos que utiliza el virus de papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982) que describen la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(5) Componente elemento potenciador

[0660] La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b por eucariotas superiores se puede incrementar mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos de potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo anti-CD79b, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(6) Componentes de terminación de la transcripción

[0661] Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y alguna vez desde 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-CD79b. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

[0662] Otros métodos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de anticuerpo anti-CD79b en un cultivo de células recombinantes de vertebrado se describen en Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; y EP 117,058.

4. Cultivo de células huésped

[0663] Las células huésped para producir el anticuerpo anti-CD79b de la presente invención se pueden cultivar en un conjunto de medios.

a. Células huésped procariotas

[0664] Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la presente invención se desarrollan en

medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Entre los ejemplos de medios adecuados se incluyen caldo de luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

[0665] También se pueden incluir en las concentraciones apropiadas cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritrol y ditiotreitolo.

[0666] Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, las temperatura preferidas varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, o incluso más preferiblemente aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente aproximadamente 7,0.

[0667] Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la presente invención, se induce la expresión de proteínas bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la presente invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se puede utilizar un conjunto de otros inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica.

[0668] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica habitualmente la ruptura del microorganismo, generalmente mediante medios, tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, se pueden eliminar la debris celular o las células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden extraer del cultivo y el sobrenadante de cultivo se filtra y concentra para una purificación posterior de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar posteriormente e identificarse utilizando métodos conocidos habitualmente, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0669] En un aspecto de la presente invención, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Existen varios procedimientos de fermentación a gran escala de alimentación por lotes para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a escala pequeña se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

[0670] En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia habitualmente después de que las células hayan crecido bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, DO550 de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células se encuentran en una fase estacionaria inicial. Se pueden utilizar un conjunto de inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células se pueden desarrollar durante periodos de tiempo más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se pueden utilizar una inducción de tiempo más larga o más corta.

[0671] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la presente invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje correcto y el pliegue de los polipéptidos anticuerpo secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil *cis,trans*-isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células huésped procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el correcto pliegue y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) *J Bio Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

[0672] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden utilizar ciertas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped se pueden modificar para realizar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[0673] En una realización, se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención cepas de *E. coli* deficientes en enzimas proteolíticos y transformados con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

b. Células huésped eucariotas

[0674] Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otros complementos necesarios en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el experto en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión de los genes

[0675] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

[0676] La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido CD79b de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de CD79b que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

6. Purificación de anticuerpo anti-CD79b

[0677] Las formas de anticuerpo anti-CD79b se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-CD79b se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

[0678] Se puede desear purificar el anticuerpo anti-CD79b a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas

etiquetadas con epítipo del anticuerpo anti-CD79b. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el anticuerpo anti-CD79b concreto producido.

[0679] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el residuo celular particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. Coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños

[0680] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesado más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSETM, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco ("chromatofocusing"), SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0681] Tras la etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente se realiza a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

G. Formulaciones farmacéuticas

[0682] Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se pueden administrar mediante cualquier ruta apropiada para la enfermedad a tratar. Los ADC se administrarán habitualmente parenteralmente, es decir, perfusión, subcutáneamente, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

[0683] Para tratar estos cánceres, en una realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco se administra mediante perfusión intravenosa. La dosis administrada mediante perfusión está en el intervalo de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente 10.000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis, en general una dosis por semana para un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el intervalo de la dosis es de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, y aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis se puede administrar una vez al día, una vez a la semana, múltiples veces por semana, pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez al día, múltiple veces al mes pero menos de una vez a la semana, una vez al mes o intermitentemente para mitigar o aliviar síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos descritos hasta la remisión del tumor o los síntomas del linfoma, leucemia en tratamiento. La administración puede continuar después de conseguir la remisión o alivio de los síntomas donde dicha remisión o alivio se prolonga mediante dicha administración continuada.

[0684] La invención también proporciona un método de aliviar una enfermedad autoinmune, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad autoinmune, una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de anticuerpo MA79b humanizado y fármaco de cualquiera de las realizaciones precedentes. En

realizaciones preferidas, el anticuerpo se administra intravenosamente o subcutáneamente. El conjugado de anticuerpo y fármaco se administra intravenosamente a una dosis en el intervalo de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 100 mg/m^2 por dosis y en una realización específica, la dosis es 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis se puede administrar una vez al día, una vez a la semana, múltiples veces por semana, pero menos de una vez al día, múltiples veces al mes pero menos de una vez al día, múltiple veces al mes pero menos de una vez a la semana, una vez al mes o intermitentemente para mitigar o aliviar síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos descritos hasta mitigar o aliviar los síntomas de la enfermedad autoinmune en tratamiento. La administración puede continuar después de conseguir la mitigación o alivio de los síntomas donde dicha mitigación o alivio se prolonga mediante dicha administración continuada.

[0685] La presente invención también proporciona un método de tratamiento de un trastorno de células B que comprende administrar a un paciente que padece un trastorno de células B, tal como un trastorno proliferativo de células B (incluyendo, sin limitación, linfoma y leucemia) o una enfermedad autoinmune, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo MA79b humanizado de cualquiera de las realizaciones anteriores, cuyo anticuerpo no está conjugado a una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo se administrará habitualmente en un intervalo de dosis de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ hasta aproximadamente 1000 mg/m^2 .

[0686] En un aspecto, la presente invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprende por lo menos un anticuerpo anti-CD79b de la invención y/o por lo menos un inmunoconjugado del mismo y/o por lo menos un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco de la invención. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende (1) un anticuerpo de la invención y/o un inmunoconjugado del mismo, y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende (1) un anticuerpo de la invención y/o un inmunoconjugado del mismo, y opcionalmente, (2) por lo menos un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación, los descritos a continuación. Los ADC se administrarán habitualmente de forma parenteral, es decir por perfusión, vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

[0687] Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado CD79b utilizadas según la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo o inmunoconjugado que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; tónicos, tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensoactivo, tal como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas a utilizar para la administración in vivo son en general estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0688] Las formulaciones de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-CD79b, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-CD79b que se une a un epítipo diferente en el polipéptido CD79b, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer concreto. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0689] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0690] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre

los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitubírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan las moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los inmunoconjugados encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones específicas de la matriz de polimérica.

[0691] Un anticuerpo se puede formular en cualquier forma adecuada para la liberación a una célula/tejido diana. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82.3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la patente de Estados Unidos No. 5,013,556.

[0692] Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. El liposoma contiene opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19).1484 (1989).

[0693] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

H. Tratamiento con anticuerpos Anti-CD79b

[0694] Para determinar la expresión de CD79b en el cáncer, están disponibles varios ensayos de detección. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido CD79b puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido bañadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y acordarse unos criterios de intensidad de tinción de la proteína CD79b tal y como se indica a continuación:

Valoración 0 - no se observa tinción o tinción de membrana en menos del 10% de células tumorales.

Valoración 1+ - se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen en parte de sus membranas.

Valoración 2+ - se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.

Valoración 3+ - se observa una tinción de membrana completa de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales.

[0695] Los tumores con una valoración 0 ó 1+ para la expresión de polipéptido CD79b pueden caracterizarse como que no sobreexpresan CD79b, mientras que los tumores con resultados 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan CD79b.

[0696] Alternativamente, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tal como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) en tejido tumoral fijado a formalina y bañado en parafina para determinar el grado (si lo hay) de sobreexpresión de CD79b en el tumor.

[0697] Puede evaluarse la amplificación o la sobreexpresión de CD79b utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una molécula (como un anticuerpo) que se une a la molécula a detectar y que está marcado con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o un marcador fluorescente) y el rastreo externo del paciente para la localización del marcador.

[0698] Tal y como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-CD79b de la invención tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-CD79b de la presente invención pueden ser útiles para la determinación del estadio de cánceres que expresan el polipéptido CD79b (por ejemplo, en radioimagen). Los anticuerpos también son

útiles para la purificación o la inmunoprecipitación de polipéptido CD79b a partir de células, para la detección y la cuantificación de polipéptido CD79b *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para matar y eliminar células que expresan CD79b de una población de células mezcladas como una etapa en la purificación de las otras células.

5
 [0699] Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia, y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-CD79b puede ser deseable especialmente en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-CD79b de la invención que reconocen tumores son útiles para aliviar los cánceres que expresan CD79b tras su diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-CD79b puede utilizarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénos, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-CD79b puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente con, terapia pre- o post-convencional. Se utilizan fármacos quimioterapéuticos, tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona, en el tratamiento del cáncer, en concreto, en pacientes con riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, a los pacientes de cáncer se les puede administrar anticuerpo anti-CD79b, conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En concreto, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, EP0600517). Se administrará el anticuerpo anti-CD79b con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo anti-CD79b conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) describe dosis de estos agentes que han sido utilizados en el tratamiento de varios cánceres. El régimen de dosificación y la dosis de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son efectivos terapéuticamente dependerán del cáncer concreto que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para los médicos expertos en la materia y pueden ser determinados por el médico.

30
 [0700] En una realización particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-CD79b conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado unido a la proteína CD79b es internalizado por la célula, dando lugar a una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en la citólisis de la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferente, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos y se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

35
 [0701] Se administran los anticuerpos anti-CD79b o conjugados a toxina de los mismos a un paciente humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, "como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

40
 [0702] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-CD79b. La administración combinada incluye la co-administración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, dicha terapia combinada da lugar a un efecto terapéutico sinérgico.

45
 [0703] También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo anti-CD79b con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado con el cáncer concreto.

50
 [0704] En otra realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-CD79b y uno o más agente quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos u otro/s agentes citotóxicos u otro/s agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y las pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes o tal como se determina empíricamente por el experto en la materia. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El anticuerpo se puede combinar con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno; una antiprogesterona, tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un antiandrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de andrógeno, el paciente se puede haber sometido previamente a una terapia anti-andrógeno y, después de que el cáncer se vuelva independiente de andrógeno, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-CD79b (y opcionalmente otros agentes descritos aquí).

[0705] A veces, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a una extracción quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación, antes, simultáneamente o posteriormente a la terapia con anticuerpos. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-CD79b.

[0706] La composición de anticuerpos de la invención se formulará, dosificará y administrará de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular en tratamiento, el mamífero particular en tratamiento, la condición clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos para los médicos. El anticuerpo opcionalmente se formula, aunque no necesariamente, con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descritos anteriormente. Estos se utilizan en general en las mismas dosificaciones y con las rutas de administración tal como se ha utilizado aquí anteriormente o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

[0707] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis y el modo de administración serán elegidos por el médico según criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo y el criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, mediante, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una pauta de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-CD79b. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede monitorizar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales y en base a criterios conocidos para el médico u otras personas expertas.

[0708] A parte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo esta comprendida por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 que se refiere al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

[0709] Existen dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la liberación *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el punto donde se necesita el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente, ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado normalmente para la liberación *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

[0710] Entre las técnicas actuales de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actuales preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica actualmente conocidos, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

[0711] Los anticuerpos anti-CD79b de la invención pueden estar en las diferentes formas comprendidas por la definición de "anticuerpo" de la presente invención. De este modo, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo o aminoácidos de secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunos conjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En

- los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo a una secuencia de polipéptido heteróloga. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se describe en detalle en las secciones de la presente invención, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o mediante el reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente de complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, se pueden utilizar algunas otras regiones Fc cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora para minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas.
- 5
- 10 **[0712]** En una realización, el anticuerpo compite por la unión o por unirse sustancialmente al mismo epítipo que los anticuerpos de la solicitud. También se contemplan los anticuerpos que tienen características biológicas de los presentes anticuerpos anti-CD79b de la invención, específicamente incluyendo el reconocimiento de tumores *in vivo* y cualquier inhibición de proliferación celular o características citotóxicas.
- 15 **[0713]** Métodos para producir los anticuerpos anteriores se describen en detalle aquí.
- [0714]** Los presentes anticuerpos anti-CD79b son útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa CD79b o el alivio de uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye, pero sin limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionadas con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores malignos, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos. Ejemplos más particulares de dichos cánceres asociados a células B, incluyen, por ejemplo, linfomas de grado elevado, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de células B, tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma no de Hodgkin, linfoma de célula de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de célula grande, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda y miclodisplasia), y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o T. Los cánceres comprenden cánceres metastásicos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo es capaz de unirse a por lo menos una parte de las células cancerosas que expresan el polipéptido CD79b en el mamífero. En una realización preferida, el anticuerpo es eficaz para destruir o eliminar células tumorales que expresan CD79b o inhiben el crecimiento de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido CD79b en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-CD79b desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento se pueden reforzar adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas se pueden conferir a un anticuerpo anti-CD79b, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe aquí. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Son preferibles toxinas, tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de las mismas.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 **[0715]** La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD79b de la invención y un portador. Para los objetivos del tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente con necesidad de dicho tratamiento, donde la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-CD79b presentes como un inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En una realización adicional, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. La presente invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-CD79b de la invención y un portador. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45
- 50 **[0716]** Otro aspecto de la invención son ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-CD79b. Se comprenden ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa, así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.
- 55 **[0717]** La invención también proporciona métodos útiles para tratar un cáncer que expresa el polipéptido CD79b o que alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD79b al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo se pueden administrar a corto plazo (agudo) o crónico, o intermitente según indique el médico. También se proporcionan métodos de inhibición del crecimiento y citólisis de una célula que expresa el polipéptido CD79b.
- 60 **[0718]** La invención también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-CD79b. Los kits que contienen anticuerpos anti-CD79b son útiles, por ejemplo, para ensayos de citólisis de células CD79b, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido CD79b a partir de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de CD79b, el kit puede contener un anticuerpo anti-CD79b acoplado a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits se pueden disponer conteniendo anticuerpos para la detección y cuantificación de CD79b *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil para la detección se pueden disponer con un marcador, tal como un fluorescente o radiomarcador.
- 65

I. Tratamientos con conjugado anticuerpo-fármaco

[0719] Se contempla que los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de la presente invención se pueden utilizar para tratar varias enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizados por la expresión de un antígeno de tumor. Entre las enfermedades o trastornos hiperproliferativos de ejemplo se incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y tumores linfoides, otros trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrófágicos, epiteliales, estromales, blastocelísticos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo autoinmune.

[0720] Los compuestos ADC que se identifican en modelos animales y ensayos basados en células se pueden analizar posteriormente en primates superiores que portan tumores y pruebas clínicas humanas. Las pruebas clínicas humanas se pueden diseñar para analizar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-CD79b o inmunocombinado de la invención en pacientes que experimentan un trastorno proliferativo de células B, incluyendo, sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto. La prueba clínica se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinaciones con pautas terapéuticas conocidas, tales como la radiación y/o quimioterapia que implica agentes quimioterapéuticos y/o citotóxicos conocidos.

[0721] En general, la enfermedad o trastorno a tratar es una enfermedad hiperproliferativa, tal como un trastorno proliferativo de células B y/o un cáncer de células B. Ejemplos de cáncer a tratar aquí incluyen, pero sin limitación, un trastorno proliferativo de células B seleccionado entre linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

[0722] El cáncer puede comprender células que expresan CD79b, de manera que los ADC de la presente invención son capaces de unirse a las células cancerosas. Para determinar la expresión de CD79b en el cáncer, existen varios ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, la sobreexpresión de CD79b se puede analizar mediante IHC. Las secciones de tejido bañadas en parafina de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo IHC y acordar un criterio de intensidad de tinción de la proteína CD79b con respecto al grado de tinción y en qué proporción se examinan las células tumorales.

[0723] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo y la discreción del médico. La molécula se administra de manera adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante perfusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis de ejemplo de ADC a administrar a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente.

[0724] Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una pauta de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-ErbB2. Pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

J. Terapia de combinación

[0725] Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) de la invención se puede combinar en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades contra el cáncer. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o pauta de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias al ADC de la combinación, de manera que no afectan de manera adversa entre sí.

[0726] El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido. Una composición farmacéutica que contiene una ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa o un enlazador de ADN.

[0727] En un aspecto, el primer compuesto es un ADC anti-CD79b de la invención y el segundo compuesto es un anticuerpo anti-CD20 (ya sea anticuerpo desnudo o un ADC). En una realización, el segundo compuesto es un anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®) o 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Otros anticuerpos útiles para la inmunoterapia combinada con ADC anti-CD79b de la invención incluyen, sin limitación, anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

[0728] Otras pautas terapéuticas se pueden combinar con la administración de un agente anticanceroso identificado según la presente invención, incluyendo, sin limitación, terapia de radiación y/o trasplantes de médula ósea y sangre periférica y/o un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, tales como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP, o COP, o agentes inmunoterapéuticos, tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

[0729] La terapia de combinación se puede administrar como una pauta simultánea o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente existe un periodo de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[0730] En una realización, el tratamiento con un ADC implica la administración combinada de un agente anticanceroso identificado aquí y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o según se determina empíricamente por el experto en la materia. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

[0731] Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son aquellas utilizadas actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) de los nuevos agentes identificados y otros agentes quimioterapéuticos o tratamientos.

[0732] La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar que es "sinérgico", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se utiliza juntos es superior que la suma de los efectos que resulta de utilizar los compuestos por separado. Un efecto sinérgico se puede conseguir cuando los principios activos se: (1) coformulan y administran o liberan simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) libera mediante formulaciones separadas alternadas o en paralelo; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se libera en una terapia alternada, el efecto sinérgico se puede conseguir cuando los compuestos se administran o liberan secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra secuencialmente una dosis eficaz de cada principio activo, es decir en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosis eficaces de dos o más principios activos.

K. Artículos de fabricación y kits

[0733] Otra realización de la invención es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico del cáncer que expresa CD79b. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico del cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-CD79b de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento del cáncer. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para administrar una composición con el anticuerpo al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0734] También se proporcionan kits que son útiles para varios objetivos, por ejemplo, para ensayos para citólisis de células que expresan CD79b, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido CD79b a partir de células. Para el aislamiento y purificación de polipéptido CD79b, el kit puede contener un anticuerpo anti-CD79b acoplada a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits se pueden disponer conteniendo los anticuerpos para la detección y cuantificación de polipéptido CD79b *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western.

Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociados con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-CD79b de la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes, tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o de detección pretendido.

L. Usos para polipéptidos CD79b

[0735] Se describen aquí métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que mimetizan el polipéptido CD79b (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido CD79b (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos candidatos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos CD79b codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión de polipéptido CD79b a partir de células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

[0736] Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

[0737] Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido CD79b codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

[0738] En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido CD79b codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido CD79b y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido CD79b a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0739] Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido CD79b particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER™) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0740] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido CD79b identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en

presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0741] Para analizar antagonistas, el polipéptido CD79b puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido CD79b indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido CD79b. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido CD79b y un potencial antagonista con receptores del polipéptido CD79b unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido CD79b puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido CD79b unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cribado ("panning") de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido CD79b y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido CD79b. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido CD79b marcado. El polipéptido CD79b puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clon que codifica el posible receptor.

[0742] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido CD79b marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0743] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido CD79b marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0744] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido CD79b y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido CD79b que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido CD79b.

[0745] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido CD79b identificado aquí, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente aquí, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0746] Si el polipéptido CD79b es intracelular se utilizan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

[0747] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concretar a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

M. Derivados de anticuerpos

[0748] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para contener grupos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolana, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propilpropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si están unidos más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

N. Método de cribado

[0749] Otra realización de la presente invención está dirigida a un método de determinación de la presencia de un polipéptido CD79b en una muestra sospechosa de contener el polipéptido CD79b, donde el método comprende exponer la muestra a un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une al polipéptido CD79b y determinar la unión del conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo al polipéptido CD79b en la muestra, donde la presencia de dicha unión es indicativa de la presencia del polipéptido CD79b en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) sospechosas de expresar el polipéptido CD79b. El conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, utilizado en el método se pueden opcionalmente marcar de forma detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

[0750] Otra realización de la presente invención está dirigida a un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, donde el método comprende (a) poner en contacto una muestra de análisis que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo, que se une a un polipéptido CD79b y (b) detectar la formación de un complejo entre conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo y el polipéptido CD79b en la muestra de análisis, donde la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el conjugado de anticuerpo y fármaco del mismo se marca de forma detectable, se une a un soporte sólido, o similares y/o la muestra de análisis de células de tejido se obtiene de un individuo sospechoso de tener un tumor canceroso.

IV. Métodos adicionales de utilización de anticuerpos anti-CD79b e inmunoconjugadosA. Métodos de diagnóstico y métodos de detección

[0751] En un aspecto, los anticuerpos anti-CD79b e inmunoconjugados de la presente invención son útiles para detectar la presencia de CD79b en una muestra biológica. El término "detectar" tal como se utiliza aquí comprende una detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En ciertas realizaciones, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan CD79b a niveles superiores en relación a otros tejidos, por ejemplo, células B y/o tejidos asociados a células B.

[0752] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de detección de la presencia de CD79b en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD79b bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b.

[0753] En un aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno asociado con el aumento de la expresión de CD79b. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de análisis con un anticuerpo anti-CD79b; determinar el nivel de expresión (cuantitativamente o cualitativamente) de CD79b por la célula de análisis mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b; y comparar el nivel de expresión de CD79b por la célula de análisis con el nivel de expresión de CD79b por una célula de análisis (por ejemplo, una célula normal del mismo origen de tejido que la célula de análisis o una célula que expresa CD79b a niveles comparables con dicha célula normal), donde un nivel más elevada de expresión de CD79b por la célula de análisis en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con la expresión aumentada de CD79b. En ciertas realizaciones, la célula de análisis se obtiene de un individuo sospechoso de tener un trastorno asociado con una expresión aumentada de CD79b. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

[0754] Trastornos proliferativos celulares de ejemplos que se pueden diagnosticar utilizando un anticuerpo de la invención incluyen un trastorno de células B y/o un trastorno proliferativo de células B que incluyen, pero sin

limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de célula de manto.

5 **[0755]** En ciertas realizaciones, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-CD79b a CD79b expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membranas obtenida de una célula que expresa CD79b en su superficie. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti- CD79b bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b en la superficie celular. Un ensayo de ejemplo para detectar la unión de un anticuerpo anti-CD79b a CD79b expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS",

15 **[0756]** Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CD79b a CD79b. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IGC).

20 **[0757]** En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD79b están marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o grupos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrodenso, quimioluminiscente y radioactivos), así como grupos, tales como enzimas o ligando, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Entre los marcadores de ejemplo se incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, en acoplamiento con una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa, o mediante la insolubilización de marcadores de spin, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

35 **[0758]** En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD79b se inmovilizan en una matriz insoluble. La inmovilización implica la separación del anticuerpo anti-CD79b de cualquier CD79b que permanece libre en la solución. Esto se consigue normalmente mediante la insolubilización del anticuerpo anti-CD79b antes del procedimiento de ensayo, como mediante la adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., U.S. 3,720,760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehído), o mediante la insolubilización del anticuerpo anti-CD79b después de la formación de un complejo ente el anticuerpo anti-CD79b y CD79b, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

40 **[0759]** Cualquiera de las realizaciones de diagnóstico o detección anteriores se puede llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar o adicionalmente a un anticuerpo anti-CD79b.

B. Métodos terapéuticos

45 **[0760]** Un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención se pueden utilizar en, por ejemplo, métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación celular, ya sea *in vivo* o *in vitro*, comprendiendo el método exponer una célula a un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado del mismo bajo condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a CD79b. "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" significa disminuir el crecimiento o proliferación de una célula en por lo menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ó 100%, e incluye la inducción de la muerte celular. En ciertas realizaciones, la célula es una célula tumoral. En ciertas realizaciones, la célula es una célula B. En ciertas realizaciones, la célula es un xenoinjerto, por ejemplo, tal como se ejemplifica aquí.

55 **[0761]** En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención se utiliza en el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de células B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo celular está asociado con un aumento de la expresión y/o actividad de CD79b. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células B está asociado con un aumento de la expresión de CD79b en la superficie de una célula B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células B es un tumor o un cáncer. Ejemplos de trastornos proliferativos de células B a tratar por los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención incluyen, pero sin limitación, linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de célula de manto.

65 **[0762]** En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado del mismo. En ciertas realizaciones, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de

células B comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de un formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado de anti-CD79b y, opcionalmente, por lo menos un agente terapéutico adicional, tales como los proporcionados a continuación. En ciertas realizaciones, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende 1) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CD79b y un agente citotóxico; y opcionalmente, 2) por lo menos un agente terapéutico adicional, tal como los descritos a continuación.

[0763] En un aspecto, por lo menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención se pueden unir a CD79b de especies diferentes de un ser humano. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención se pueden utilizar para unirse a CD79b, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene CD79b, en humanos, o en otros mamíferos que tienen un CD79b con el que reacciona de forma cruzada un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, monos cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado se pueden utilizar para reconocer CD79b mediante el contacto del anticuerpo o inmunoconjugado con CD79b para formar un anticuerpo o complejo inmunoconjugado-antígeno de manera que una citotoxina conjugada del inmunoconjugado accede al interior de la célula. En una realización, el CD79b es CD79b humano.

[0764] En una realización, un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado se pueden utilizar en un método para unirse a CD79b en un individuo que padece un trastorno asociado con un aumento de la expresión y/o actividad de CD79b, comprendiendo el método administrar al individuo el anticuerpo o inmunoconjugado, de manera que se une el CD79b en el individuo. En una realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unidos se internalizan en la célula B que expresa CD79b. En una realización, el CD79b es CD79b humano, y el individuo es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede ser un mamífero que expresa CD79b al que se une un anticuerpo anti-CD79b. Además el individuo puede ser un mamífero al que se ha introducido CD79b (por ejemplo, mediante la administración de CD79b o mediante la expresión de un transgén que codifica CD79b).

[0765] Un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado se pueden administrar a un humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado se pueden administrar a un mamífero no humano que expresa CD79b con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a éste último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención (por ejemplo, análisis de dosis y evolución con el tiempo de la administración).

[0766] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede coadministrar con por lo menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP, o COP, o a agentes inmunoterapéuticos, tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®), donde la terapia de combinación es útil en el tratamiento de cánceres y/o trastornos de células B, tales como trastornos proliferativos de células B que incluyen linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresiva, NHL agresiva recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

[0767] Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención puede tener lugar antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención también se pueden utilizar en combinación con terapia de radiación.

[0768] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la presente invención (y cualquier agente terapéutico adicional o adyuvante) se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra de manera adecuada mediante infusión a pulsos, particularmente con dosis descendientes del anticuerpo o inmunoconjugado. La dosificación se puede realizar mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0769] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención se formularían, dosificarían o y administrarían de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno en particular en tratamiento, el mamífero en particular en tratamiento, la condición clínica del

paciente individual, la causa del trastorno, el punto de liberación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo o inmunocombinado no necesita formularse, aunque opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad anticuerpo o inmunocombinado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Éstos se utilizan en general en las mismas dosis y con las rutas de administración descritas aquí, o desde aproximadamente el 1 al 99% de las dosis descritas aquí, o en cualquier dosis y cualquier ruta que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

[0770] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo o inmunocombinado de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo o inmunocombinado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunocombinado se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunocombinado, y el criterio del médico. El anticuerpo o inmunocombinado se administra de manera adecuada al paciente de una vez o mediante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10mg/kg) de anticuerpo o inmunocombinado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendría en general hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo o inmunocombinado estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunocombinado. Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe desde aproximadamente dos hasta aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunocombinado). Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguido de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

C. Ensayos de actividad

[0771] Los anticuerpos anti-CD79b e inmunocombinados de la invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de actividad

[0772] En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-CD79b o inmunocombinados de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular (por ejemplo, actividad "citotóxica"), o la capacidad de inducir la muerte celular, incluyendo la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunocombinados que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

[0773] En ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b o inmunocombinado del mismo por su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vitro. Son bien conocidos en la técnica los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular. Ciertos ensayos para proliferación celular, ejemplificados por los ensayos de "citólisis" descritos en la presente invención, miden la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular luminescente CellTiter-Glo™, que está disponible comercialmente en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en un cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Ver Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, patente de Estados Unidos No. 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible para cribado de alto rendimiento automatizado (HTS). Ver Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento del ensayo implica la adición de un sólo reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Esto da lugar a lisis celular y la generación de una señal luminescente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminescente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Pueden registrarse los datos mediante un luminómetro o dispositivo de formación de imágenes de cámara de CCD. La salida de luminiscencia se expresa como unidades luminosas relativas (RLU).

[0774] Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MTT", un ensayo colorimétrico que mide la oxidación del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán mediante la reductasa mitocondrial. Como el ensayo de CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Ver, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, y Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-

3882.

[0775] En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b por su capacidad de inducir la muerte celular in vitro. Los ensayos para la inducción de muerte celular son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, dichos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de la integridad de la membrana tal y como se indica mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (*ver* Moore et al. (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo de captación de PI de ejemplo, se cultivan las células en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS inactivado por calor al 10% (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. De este modo, se realiza el ensayo en ausencia de células del complemento y células efectoras inmunes. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en platos de 100 x 20 mm y se deja que se unan durante toda la noche. Se extrae el medio y se sustituye por medio nuevo solo o medio que contiene varias concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Se incuban las células durante un periodo de tiempo de 3 días. Después del tratamiento, se lavan las monocapas con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación se centrifugan las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se resuspende el pélet en 3 ml de tampón de unión de Ca^{2+} frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2,5 mM) y se alícuotan en tubos de 12 x 75 mm tapados con colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para extraer los grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se analizan las muestras utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest de FACSCONVERT™ (Becton Dickinson). De este modo se identifican anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular tal y como se determina mediante la captación de PI.

[0776] En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado por su capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) in vitro. Un ensayo de ejemplo para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo de unión a anexina de ejemplo, se cultivan células y se siembran en placas tal y como se explica en el párrafo anterior. Se extrae el medio y se sustituye con medio nuevo solo o medio que contiene de 0,001 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un periodo de incubación de tres días, se lavan las monocapas con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación se centrifugan las células, se resuspenden en tampón de unión de Ca^{2+} , y se alícuotan en tubos tal y como se explica en el párrafo anterior. A continuación los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo anexina V-FITC) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se analizan las muestras utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software CellQuest de FACSCONVERT™ (BD Biosciences). De este modo se identifican anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina en comparación con el control. Otro ensayo de ejemplo para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico de ELISA para ADN de histona para detectar la degradación internucleosomal del ADN genómico. Dicho ensayo puede realizarse utilizando, por ejemplo, el kit de ELISA de Detección de Muerte Celular (Roche, Palo Alto, CA).

[0777] Las células para uso en cualquiera de los ensayos in vitro anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan de modo natural CD79b o que han sido manipuladas para expresar CD79b. Dichas células incluyen células tumorales que sobreexpresan CD79b en relación con células normales del mismo origen tisular. Dichas células también incluyen líneas celulares (incluyendo líneas celulares tumorales) que expresan CD79b y líneas celulares que no expresan normalmente CD79b pero que se han transfectado con ácido nucleico que codifica CD79b.

[0778] En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado del mismo por su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vivo. En ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado del mismo según su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Pueden utilizarse para estas pruebas sistemas de modelo in vivo, tales como modelos de xenoinjerto. En un sistema de xenoinjerto de ejemplo, se introducen células tumorales humanas dentro de un animal no humano inmunocomprometido de forma adecuada, por ejemplo un ratón SCID. Se administra al animal un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado de inhibir o disminuir el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones del sistema de xenoinjerto anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Dichas células útiles para preparar modelos de xenoinjertos incluyen líneas celulares de leucemia y linfoma humano, que incluyen, sin limitación, las células BJAB-luc (una línea celular de linfoma de Burkitt negativo de EBV transfectada con el gen informador de luciferaza), células Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), células SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, AAC 495), células DoHH2 (véase Kluin-Neilemans, H.C. et al., *Leukemia* 5:221-224 (1991), y Kluin-Neilemans, H.C. et al., *Leukemia* 8:1385-1391 (1994)), células Granta-519 (véase Jadayel, D.M. et al, *Leukemia* 11(1):64-72 (1997)). En ciertas realizaciones, se introducen las células tumorales humanas en un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido mediante inyección subcutánea o mediante trasplante en un sitio adecuado, tal como una almohadilla adiposa mamaria.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

[0779] En un aspecto, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b por su actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se evalúa un anticuerpo anti-CD79b por su capacidad de unirse a CD79b expresado en la superficie de una célula. Para dicha evaluación puede utilizarse un ensayo FACS.

[0780] En un aspecto, pueden utilizarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que

compita con anticuerpo 2F2 murino y/o anticuerpo 2F2.D7 humanizado por la unión con CD79b. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) al que está unido por anticuerpo 2F2 murino y/o anticuerpo 2F2.D7 humanizado. Los ensayos de competición de ejemplo incluyen, pero sin limitación, ensayos de rutina como aquellos proporcionados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Se proporcionan procedimientos de ejemplo detallados para localizar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50% o más.

[0781] En un ensayo de competición de ejemplo, se incubaba CD79b inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a CD79b (por ejemplo, anticuerpo 2F2 murino y/o anticuerpo 2F2.D7 humanizado) y un segundo anticuerpo sin marcar que se evalúa por su capacidad de competir con el primer anticuerpo por unirse a CD79b. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incubaba CD79b inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a CD79b, se elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el CD79b inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el CD79b inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra evaluada en comparación con la muestra control, entonces esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por unirse a CD79b. En ciertas realizaciones, el CD79b inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa CD79b en su superficie.

[0782] En un aspecto, los anticuerpos anti-CD79b purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y de exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

[0783] En una realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras pero no todas, que lo convierten en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, se miden las actividades Fc del anticuerpo para asegurarse de que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de la unión a FcR (de ahí probablemente que carezca de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). En las Patentes de Estados Unidos nº 5.500.362 o 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). De modo alternativo, o adicional, puede evaluarse la actividad *in vivo* de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C₁q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C₁q y de ahí la falta de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo tal y como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y purificación/semivida *in vivo* utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

[0784] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0785] Los reactivos comercialmente disponibles referidos en los ejemplos se utilizaron según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos utilizados en los ejemplos incluyen anticuerpos disponibles comercialmente e incluyen, pero sin limitación, anti-CD79b (anticuerpo adquirido de Biomedica (Foster City, CA) o BD Bioscience (San Diego, CA) o Ancell (Bayport, MN)), anti-CD79b (generado a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio de 1993), y anticuerpos anti-CD79b quiméricos (que comprende dominios variables de anticuerpos generados a partir de hibridomas depositados con la ATCC como HB11413 el 20 de julio de 1993). El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, mediante números de acceso ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpo anti-CD79b humanizado

[0786] Los números de residuos son según Kabat (Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan abreviaturas de

aminoácido de una letra. Las degeneraciones del ADN se representan utilizando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/(i/T), V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T).

5 [0787] El anticuerpo 2F2 murino (mu2F2) se describe en el documento US2007/207142 A1. El anticuerpo 2F2 quimérico (referido aquí como "ch2F2") se generó como se ha descrito previamente en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 11/462,336, presentada el 3 de agosto de 2006.

A. Injerto de anticuerpo anti-Cd79b humanizado

10 [0788] Se generó un anticuerpo anti-CD79b humanizado. Los dominios VL y VH de anticuerpo 2F2 murino (mu2F2) se alinearon con los dominio kappa I (hukl) de VL de consenso humano y de VH de consenso del subgrupo III (hulll) humano. Para producir el injerto de HVR, se utilizó el armazón de VH aceptor, que difiere del dominio de VH consenso del subgrupo III humano en las 3 posiciones: R71A, N73T, y L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Las regiones hipervariables del anticuerpo 2F2 murino (mu2F2) se diseñaron en el armazón de consenso humano aceptor para generar un injerto de HVR directo de 2F2 (aquí referido como "injerto de 2F2" o "anticuerpo humanizado injertado con 2F2" o "injerto de hu2F2"). En el dominio VL se injertaron las siguientes regiones al aceptor consenso humano: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) (Figura 7). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 93-102 (H3) (Figuras 8A y 8B). MacCallum et al. (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996)) analizaron las estructuras cristalinas de complejo de anticuerpo y antígeno y se halló que las posiciones 49, 93 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto y por tanto se incluyen en la definición de HVR-H2 y HVR-H3 cuando se inmunizan anticuerpos.

20 [0789] Se generó la variante de injerto directo (injerto 2F2) mediante mutagénesis Kunkel, como Fab expresado en fago y como IgG, utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Los clones correctos se evaluaron mediante secuenciación de ADN.

B. Variantes de injertos de anticuerpos anti-CD79b humanizados

30 [0790] Las variantes de injerto de anticuerpo anti-CD79b que incluían diversidad mutacional en las regiones hipervariables del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 se generaron utilizando bibliotecas de fagos. Las variantes de injerto de anticuerpo anti-CD79b incluían múltiples variaciones de posición en las HVR (Figura 9).

C. Selección de fagos

35 [0791] Para la selección de fagos, se inmovilizó huCD79b_{ecd} (2 µg/ml) en PBS en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante por lo menos 1 hora utilizando un Bloqueador de Caseína (Pierce). Se recogieron los fagos del sobrenadante de cultivo y se suspendieron en PBS que contenía BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,05% (PBSBT). Después de la adición de la biblioteca de fagos y la selección de fagos durante 2 horas, se lavaron los pocillos de microtitulación de manera extensa con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST) para eliminar los fagos no unidos y los fagos unidos se eluyeron incubando los pocillos con HCl 100 mM durante 30 minutos. La rigurosidad de selección se puede incrementar durante rondas sucesivas de selección mediante el incremento del número de lavados con PBST o incubando con huCD79b_{ecd} soluble para incrementar los periodos de tiempo antes de la elución.

45 [0792] Los fagos eluidos se neutralizaron con Tris 1 M, pH 8 y se amplificaron utilizando células XL1-blue y fago auxiliar M13/KO7 y se desarrollaron durante la noche a 37 °C en 2YT, carbnacilina 50 µg/ml. Los títulos de fagos eluidos de un pocillo que contiene diana se compararon con los títulos de fagos recuperados de un pocillo que no contenía diana para valorar el enriquecimiento.

50 D. Producción de Fab y producción de IgG

[0793] Para expresar la proteína Fab para las mediciones de afinidad, se introdujo un codón de parada entre la cadena pesada y g3 en el vector de expresión de fagos. Los clones se transformaron en células de E. coli 34B8 y se desarrollaron en medio C.R.A.P. completo a 30°C (Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). Las células se recogieron mediante centrifugación, se suspendieron en PBS, PMSF 100 µM, benzamidina 100 µM, EDTA 2,4 mM y se abrieron por rotura utilizando un microfluidizador. El Fab se purificó con cromatografía de afinidad de proteína G.

60 [0794] Para fines de cribado, las variantes de IgG se produjeron inicialmente en células 293. Los vectores que codificaban VL y VH (25 µg) se transfectaron en células 293 utilizando el sistema FuGene. Se mezclaron 500 µl de FuGene con 4,5 ml de medio DMEM que no contenía FBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió cada cadena (25 µg) a esta mezcla y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y a continuación se transfirieron a un matraz para la transfección durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5%. El día siguiente se extrajo el medio que contenía la mezcla de transfección y se sustituyó con 23 ml de medio PS04 con elementos traza 0,1 ml/L (A0934) e insulina (A0940) 10 mg/L. Las células se incubaron durante 5 días adicionales, después de lo cual se extrajo el medio a 1000 rpm durante 5 min y se filtró de forma estéril utilizando un filtro de

unión a proteínas de bajo peso molecular de 0,22 μ m. Las muestras se pudieron guardar a 4°C después de la adición de 2,5 ml de PMSF al 0,1% PMSF para cada 125 ml de medio.

E. Determinación de Afinidad (Análisis Biacore)

[0795] Para la determinación de la afinidad de las variantes de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2, el dominio extracelular de CD79b humano (huCD79b_{ecd}) se expresó en células CHO solas o como una fusión a Fc (huGD79b_{ecd}-Fc) y se purificó mediante medios convencionales. Además, se sintetizó un péptido de 16 aminoácidos (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 78) que contenía el epítipo para 2F2 mediante medios convencionales.

[0796] La caracterización del epítipo para el anticuerpo 2F2 (marcado como "péptido de prueba" en la Figura 14) se describió previamente en la publicación No. US2007207142, solicitada el 3 de agosto de 2006. El epítipo para el anticuerpo 2F2 se localizó en la región de péptido extracelular distal al dominio transmembrana y estaba presente en las formas de longitud completa y truncadas de CD79b humano (Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002)), que se han descrito en células B normales y malignas (Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9): 651-9 (1995); Alfano et al., Blood, 93(7): 2327-35 (1999)). La forma truncada de CD79b carece del dominio de tipo Ig extracelular completo (el dominio de tipo Ig extracelular que no está presente en la forma truncada empalmada de CD79b está encuadrado en la figura 14).

[0797] La unión de Fab y variantes IgG de ch2F2, el anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (injerto hu2F2) o la variante 7 de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) a huCD79b_{ecd} o CD79b-Fc o el péptido de 16 aminoácidos que contiene el epítipo para 2F2 inmovilizados se midió mediante resonancia de plasmones de superficie. Las determinaciones de afinidad se realizaron mediante resonancia de plasmones de superficie utilizando un Biacore™-2000. El antígeno, huCD79b_{ecd} o huCD79b-Fc, se inmovilizó (aproximadamente 50 – 200 RU) en acetato de sodio 10 mM pH 4,8 en un chip sensor CM5. En experimentos que midieron la unión al péptido de 16 aminoácidos (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 78), que contenía el epítipo (aminoácidos 1-11 de la SEQ ID NO: 78) para 2F2, el péptido biotinilado se capturó (aproximadamente 20 RU) en un chip sensor recubierto de estreptavidina. La variante de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 purificado (como Fab o IgG) (una dilución en serie de 2 veces de 0,5 a 1000 nM en PBST) se inyectó a una velocidad de flujo de 30 μ L/min. Cada muestra se analizó con una asociación de 4 minutos y una disociación de 10 minutos. Después de cada inyección, se regeneró el chip utilizando glicina 10 mM pH 1,7.

[0798] La respuesta de unión se corrigió restando una célula del flujo de control de las células de flujo de variante de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (como Fab o IgG). Se utilizó un modelo de Languir 1:1 de ajuste simultáneo de K_{on} y K_{off} para el análisis cinético.

F. Análisis de unión (análisis FACS)

[0799] Para determinar adicionalmente la unión de la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) que aparecen de las bibliotecas de SR para células BJAB, se analizó la unión de anticuerpos hu2F2.D7 (variantes de IgG) marcados a células BJAB utilizando un análisis FACS.

[0800] Para el análisis FACS, se marcaron anticuerpos monoclonales ch2F2 y 2F2.D7 con el kit de marcaje de IgG humanas Zenon® Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Carlsbad, California), según las instrucciones del fabricante. Las células BJAB (1 x 10⁶ en un volumen de 100 μ l) se tiñeron con 1 μ g cada una de anticuerpos marcados, isotipo hlgG1, ch2F2 o 2F2.D7.

G. Determinación de la afinidad (análisis Scatchard)

[0801] Para determinar adicionalmente la unión de las variantes de IgG de la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) que tienen cambios en HVR-H3, se analizó la unión del anticuerpo anti-CD79b (con el mismo epítipo que ch2F2) yodado a células BJAB que expresan CD79b humano y CD79b cinomólogo usando la competición con ch2F2 no marcado y se realizó un análisis Scatchard.

[0802] Para el análisis Scatchard, 0,5 nM de anticuerpo anti-CD79b humano con el mismo epítipo que ch2F2 marcado con I¹²⁵ o 0,5 nM de la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) marcado con I¹²⁵ compitieron contra ch2F2 o hu2F2.D7 no marcados, respectivamente, que variaban de 50 a 0,02 nM (12 etapas dilución en serie 1:2) en presencia de una línea de BJAB transfectada que expresa de forma estable CD79b cinomólogo y CD79b humano endógeno. Después de una incubación de cuatro horas a 4°C, las células se lavaron y se leyeron los recuentos de residuos celulares mediante un contador gamma (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Todos los puntos se realizaron por triplicado y se contaron durante 10 minutos. El CPM promedio se utilizó para el cálculo de K_d utilizando el programa New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA).

Resultados y discusión

A. Resultados de la generación de anticuerpo anti-CD79b humanizado

[0803] El armazón aceptor humano utilizado para la generación de anticuerpo anti-CD79b humanizado comprende el dominio VL kappa I humano consenso y una variante del dominio VH consenso del subgrupo III humano. La variante del dominio VH tiene 3 cambios con respecto al consenso humano: R71A, N73T y L78A. Los dominios VL y VH de 2F2 murino (mu2F2) se alinearon con los dominios de kappa I y subgrupo III humanos; cada HVR se identificó y a continuación se injertó en el armazón aceptor humano para generar un injerto de HVR que se podía expresar como un Fab en fago (Figuras 7 y 8).

[0804] El fago que expresa el injerto de 2F2 como Fab se unió a huCD79b_{ecd} inmovilizado (datos no mostrados). Además, el injerto de 2F2 como Fab no se unió a huCD79b_{ecd} y el injerto de 2F2 como Fab o como una IgG no se unió a huCD79b_{ecd}-Fc (figura 10, NB = no unión) tal como se determina mediante análisis Biacore.

1. Reparación de CDR

[0805] Se identificaron variantes de anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 que fueron capaces de unirse a huCD79b_{ecd} inmovilizado con los siguientes cambios de secuencia.

[0806] Sólo los cambios de secuencia que reconocen HVR en L3 se observaron en las bibliotecas que contenían múltiples cambios de posición y se muestran en la Figura 9 (para mutación L3: W89F e Y96F (mutación en 2F2-D7) (SEQ ID NO: 18).

[0807] Los clones seleccionados se reformatearon como Fab para el análisis mediante FACS y como IgG para el análisis posterior mediante Biacore y Scatchard.

a. Determinación de la afinidad (análisis Biacore)

[0808] Tal como se muestra en la figura 10, que muestra un análisis Biacore, esta estrategia de reparación de CDR identificó cambios de secuencia individuales en HVR-L3 (hu2F2.D7) que recuperan la afinidad del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2. Los ensayos de resonancia de plasmones de superficie mostraron que los cambios en L3 (hu2F2.D7) presentaban una afinidad similar (figura 10) que ch2F2 cuando se unía a huCD79b_{ecd} o el péptido de 16 aminoácidos (SEQ ID NO: 78) que contenía el epítipo (aminoácidos 1-1 de la SEQ ID NO: 78) para 2F2 inmovilizados según se determina mediante análisis Biacore.

b. Determinación de afinidad (análisis Scatchard)

[0809] Tal como se evalúa mediante análisis Scatchard, esta estrategia de reparación de CDR identificó cambios de secuencia que mejoraron la afinidad del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2. Específicamente, los ensayos de unión celular mostraron que la afinidad de ch2F2 y la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (hu2F2.D7) (reformateado como IgG) por la unión a células BJAB que expresan de forma estable CD79b cinomólogo y CD79b humano endógeno era con valores de K_d de 1 nM (ch2F2; $K_d = 0,99 \pm 0,23$ nM) y 2 nM (hu2F2.D7; $K_d = 2,0 \pm 0,53$ nM), respectivamente (datos nos mostrados), según se determina mediante análisis Scatchard.

c. Determinación de unión (análisis FACS)

[0810] Tal como se evalúa mediante análisis FACS, esta estrategia de reparación de CDR identificó cambios de secuencia que mejoraron la unión del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 (injerto de hu2F2) a células BJAB (datos no mostrados). Específicamente, el análisis FACS de hu2F2.D7 monoclonal (variantes de IgG) identificadas a partir de bibliotecas de fagos a células BJAB mostró la unión de la variante de hu2F2.D7 a células BJAB (datos no mostrados).

B. Discusión de la humanización de anticuerpos 2F2

[0811] Partiendo de un injerto de las 6 HVR de 2F2 murinas (definida como las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 93-102 (H3)) en VL de kappa I consenso humano y VH de subgrupo III (que contienen A71, T73 y A78), se utilizó la reparación de CDR para identificar cambios en las HVR 1-6 que mejoran la afinidad de unión. Los cambios en la secuencia de HVR identificados en la figura 10 condujeron a variantes humanizadas de 2F2 con afinidades similares a ch2F2.

EJEMPLO 2: Generación de conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD79b (ADCs)

[0812] Para analizar la eficacia de las variantes de IgG de las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2, las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado con 2F2 se conjugaron a fármacos, tales como DM1. Las variantes conjugadas a DM1 incluían las variantes que tienen cambios en HVR-H3.

[0813] Los fármacos utilizados para la generación de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADCs) para anticuerpos

anti-CD79b incluían maitansinoide DM1 y pueden incluir derivados de dolastatina 10, monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF). (Véase US 2005/0276812; US 2005/0238649; Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006)). DM1, MMAE y MMAF son inhibidores mitóticos que son al menos 100 veces más tóxicos que los inhibidores mitóticos de vinca alcaloide utilizados en tratamientos quimioterapéuticos de NHL (Doronina et al., *Bioconjug. Chem.*, 17: 114-123 (2006); Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003); Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). Los enlazadores útiles para la generación de los ADC son BMPEO, SPP o SMCC (también referido aquí como "MCC") para DM1 y MC o MC-vc-PAB para MMAE y MMAF. Para DM1, los anticuerpos se unieron al grupo tio de DM1 y a través del grupo ϵ -amino de lisina utilizando el reactivo enlazador SMCC. Alternativamente, para DM1, los anticuerpos se pueden unir a DM1 a través del grupo ϵ -amino de lisina utilizando el enlazador SPP. SPP (pentanoato de N-succinimidil 4-(2'-piridilditio)) reacciona con el grupo amino épsilon de lisinas para dejar un enlazador reactivo de disulfuro de 2-piridilo en la proteína. Con los enlazadores SPP, tras la reacción con un sulfhidrilo libre (por ejemplo DM1), el grupo piridilo se desplaza, dejando el DM1 unido a través de un enlace disulfuro reducible. El DM1 unido a través de un enlazador SPP se libera bajo condiciones reductoras (es decir, por ejemplo, en las células), mientras que DM1 unido a través del enlazador SMCC es resistente a separarse en condiciones reductoras. Además, los ADC SMCC-DM1 inducen la toxicidad celular si el ADC se internaliza y se dirige al lisosoma causando la liberación de lisina-N^F-DM1, que es un agente antimitótico efectivo en el interior de la célula, y cuando se libera de la célula, la lisina-N^F-DM1 no es tóxica (Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). Para MMAE y MMAF, los anticuerpos se pueden unir a MMAE o MMAF a través de la cisteína mediante maleeimidocaproil-valina-citrulina (vc)-p-aminobenciloicarbonylo (MC-vc-PAB). Para MMAF, los anticuerpos se pueden unir alternativamente a MMAF a través de la cisteína mediante el enlazador maleeimidocaproilo (MC). El enlazador MC-vc-PAB es separable por proteasas intercelulares, tales como catepsina B y cuando se separa, se libera el fármaco libre (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)), mientras que el enlazador MC es resistente a la separación por proteasas intracelulares.

[0814] Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anti-CD79b, utilizando SMCC y DM1, se generaron de forma similar al procedimiento descrito en US 2005/0276812. Los anticuerpos anti-CD79b purificados se intercambiaron en el tampón en una solución que contenía fosfato de potasio 50 mM y EDTA 2 mM, pH 7,0. Se disolvió SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) en dimetilacetamida (DMA) y se añadió a la solución de anticuerpo para producir una proporción molar de SMCC/Ab de 10:1. La reacción se dejó proceder durante tres horas a temperatura ambiente con mezclado. El anticuerpo modificado con SMCC se purificó posteriormente en una columna de desalación GE Healthcare HiTrap (G-25) equilibrada en citrato de sodio 35 mM con NaCl 150 mM y EDTA 2 mM, pH 6,0. Se añadió DM1, disuelto en DMA, a la preparación de anticuerpo con SMCC para producir una proporción molar de DM1 con respecto a anticuerpo de 10:1. La mezcla de reacción se dejó proceder durante 4-20 horas a temperatura ambiente con mezclado. La solución de anticuerpo modificado con DM1 se diafiltró con 20 volúmenes de PBS para eliminar el DM1 no reaccionado, se filtró de forma estéril y se guardó a 4 grados C. Habitualmente, se consiguió un rendimiento del 40-60% de anticuerpo a través de este proceso. La preparación fue normalmente superior al 95% monomérico evaluado mediante filtración en gel y dispersión de luz láser. Dado que DM1 tiene un máximo de absorción a 252 nm, la cantidad de fármaco unido al anticuerpo se pudo determinar mediante mediciones de absorción diferencial a 252 y 280 nm. Habitualmente, la proporción de fármaco con respecto a anticuerpo fue de 3 a 4.

[0815] Se pueden generar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anticuerpo anti-CD79b descritos aquí utilizando enlazadores SPP-DM1 de forma similar al procedimiento descrito en US 2005/0276812. Los anticuerpos anti-CD79b purificados se intercambiaron en el tampón en una solución que contenía fosfato de potasio 50 mM y EDTA 2 mM, pH 7,0. Se disolvió SPP (Immunogen) en DMA y se añadió a la solución de anticuerpo para producir una proporción molar de SPP/Ab de aproximadamente 10:1, dependiendo la proporción exacta de la carga de fármaco deseada del anticuerpo. Una proporción de 10:1 dará lugar normalmente a una proporción de fármaco con respecto a anticuerpo de aproximadamente 3-4. El SPP se dejó reaccionar durante 3-4 horas a temperatura ambiente con mezclado. El anticuerpo modificado con SPP se purificó posteriormente en una columna de desalación GE Healthcare HiTrap (G-25) equilibrada en citrato de sodio 35 mM con NaCl 150 mM y EDTA 2 mM, pH 6,0 o solución salina de fosfato, pH 7,4. Se disolvió DM1 en DMA y se añadió a la preparación de anticuerpo con SPP para producir una proporción molar de DM1 con respecto a anticuerpo de 10:1, lo cual da lugar a un exceso molar de 3-4 veces sobre los enlazadores de SPP disponibles en el anticuerpo. La reacción con DM1 se dejó proceder durante 4-20 horas a temperatura ambiente con mezclado. La solución de anticuerpo modificado con DM1 se diafiltró con 20 volúmenes de PBS para eliminar el DM1 no reaccionado, se filtró de forma estéril y se guardó a 4 grados C. Habitualmente, se consiguió un rendimiento del 40-60% de anticuerpo o superior con este proceso. El conjugado de anticuerpo y fármaco es normalmente superior al 95% monomérico evaluado mediante filtración en gel y dispersión de luz láser. La cantidad de fármaco unido se determina mediante mediciones de absorción diferencial a 252 y 280 nm tal como se describe para la preparación de conjugados de SMCC-DM1 (descrito anteriormente).

[0816] También se pueden generar conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anticuerpos anti-CD79b descritos aquí utilizando los enlazadores de fármacos MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE o MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF de manera similar al procedimiento descrito en US 2005/0238649. Se disuelve el anticuerpo anti-CD79b purificado en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 y se trató posteriormente con un exceso de ditiotreitól (DTT) 100 mM. Después de la incubación a 37 grados C durante aproximadamente 30 minutos, se intercambió el tampón mediante elución sobre resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El

que tiene un componente de maleimida y un componente auto-inmolativo de para-aminobenzilcarbamoilo (PAB) para monometilauristatina E (MMAE) o monometilauristatina F (MMAF). Las toxinas utilizadas fueron DM1. Las toxinas adicionales pueden incluir MMAE o MMAF.

5 **[0823]** Los anticuerpos de CD79b para este experimento incluían anticuerpos 2F2 quiméricos (ch2F2) tal y como se describen en la publicación US nº 2007207142, solicitada el 3 de agosto de 2006 (véase el ejemplo 1A), además de
10 variantes de anticuerpo “humanizado” Injertado con 2F2 descritas en el presente documento (véase el ejemplo 1). Los anticuerpos adicionales pueden incluir anticuerpos 2F2 generados a partir de hibridomas depositados con la ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

15 **[0824]** Los controles negativos incluyeron conjugados (SMCC-DM1) basados en anti-HER2 (HERCEPTIN® (trastuzumab)).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de BJAB con luciferasa

20 **[0825]** En un transcurso de 36 días de tiempo, la variante 7 del anticuerpo “humanizado” injertado con 2F2 (variante hu2F2.D7) (reformateado como IgG) (y el anticuerpo anti-CD79 quimérico (ch2F2) conjugado a DM1 (hu2F2.D7-SMCC-DM1 y ch2F2-SMCC-DM1, respectivamente), mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de BJAB con luciferasa en comparación con el control negativo, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). Se administraron ADC en una única dosis (tal y como se indica en la Tabla 7) en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, los anticuerpos hu2F2.D7-SMCC-DM1 (reformateados como IgG) y ch2F2-SMCC-DM1 inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (Figura 19). Adicionalmente, en la
25 Tabla 7, se indican el número de ratones del número total analizado que muestran PR = Regresión Parcial (en la que el volumen tumoral en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50% del volumen del tumor medido en el día 0) o CR = Remisión Completa (en la que el volumen tumoral en cualquier momento después de la administración cayó hasta 0 mm³).

30 Tabla 7: Xenoinjerto BJAB-Luc (20 millones de células/ratón) en ratones SCID

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	PR	CR	Dosis (mg/kg)	Ab	Dosis fármaco - DM1 (µg/m ²)	Proporción de fármaco (fármaco/Ab)
Control anti-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	2		100	3,3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	1/10	2,3		100	3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	0/10	1,2		50	3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	1/10	2,9		100	2,3
hu2F2.D7-SMCC-DM 1	1/10	0/10	1,5		50	2,3

2. Xenoinjertos de Granta-519 (linfoma de células de manto humano)

35 **[0826]** En un transcurso de 14 días de tiempo, la variante 7 del anticuerpo “humanizado” injertado con 2F2 (variante hu2F2.D7) (reformateado como IgG) (hu2F2.D7-SMCC-DM1) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de Granta-519 en comparación con el control negativo, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). Se administraron ADC en una única dosis (tal y como se indica en la tabla 8) en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, los anticuerpos hu2F2.D7-SMCC-DM1 (reformateados como IgG) inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (figura 20A).
40

[0827] Adicionalmente, el tratamiento con hu2F2.D7-SMCC-DM1 y el control HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) no dio lugar a una disminución en el porcentaje de peso corporal de los ratones (Figura 20B). Más adicionalmente, en la tabla 8, se indica el número de ratones del número total analizado que
45 mostró PR = Regresión Parcial (en la que el volumen tumoral en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50% del volumen del tumor medido en el día 0) o CR = Remisión Completa (en la que el volumen tumoral en cualquier momento después de la administración cayó hasta 0 mm³).

50 Tabla 8: Xenoinjerto Granta-519 (20 millones de células/ratón) en ratones SCID

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	PR	CR	Dosis Ab (mg/kg)	Dosis fármaco - DM1 (µg/m ²)	Proporción de fármaco (Fármaco /Ab)
Control anti-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	206	3,4
Hu2F2.D7-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	166	2,8

[0828] A la luz de la capacidad de los ADC de anticuerpo “humanizado” injertado con 2F2 de inhibir significativamente la progresión tumoral en xenoinjertos, las moléculas CD79b pueden ser dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir leucemia linfocítica crónica), y otros cánceres de células hematopoyéticas. Adicionalmente, los ADC “humanizados” injertados con 2F2 son útiles para reducir el crecimiento de tumores in vivo, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), y otros cánceres de células hematopoyéticas.

10 EJEMPLO 4: Colocalización del anticuerpo CD79b

[0829] Para determinar donde se liberan los anticuerpos “humanizados” injertados con 2F2 y variantes de anticuerpo tras la internalización dentro de la célula, deben evaluarse estudios de colocalización de los anticuerpos anti-CD79b internalizados dentro de las líneas de células B en líneas celulares de Ramos. LAMP-1 es un marcador para lisosomas y endosomas tardíos (Kleijmeer et al., Journal of Cell Biology, 139(3): 639-649 (1997); Hunziker et al., Bioessays. 18:379-389 (1996); Mellman et al., Annu. Rev. Dev. Biology, 12: 575-625 (1996)), incluyendo compartimentos MHC de clase II (MIICs), que es un compartimento de tipo lisosoma/endosoma tardío. HLA-DM es un marcador para MIICs.

[0830] Se incuban células de Ramos durante 3 horas a 37°C con 1 µg/ml de anticuerpos “humanizados” injertados con MA79b y variantes de anticuerpo, bloque FcR (Miltenyi) y 25 µg/ml de Alexa647-Transferrina (Molecular Probes) en medio completo sin carbonato (Gibco) con la presencia de leupeptina (Roche) 10 µg/ml y pepstatina 5 µM (Roche) para inhibir la degradación lisosomal. A continuación se lavan dos veces las células, se fijan con paraformaldehído al 3% (Electron Microscopy Sciences) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se detuvo con NH₄Cl 50 mM (Sigma), se permeabilizan con Saponina al 0,4%/FBS al 2%/BSA al 1% durante 20 minutos y a continuación se incuban con 1 µg/ml de Cy3 anti-ratón (Jackson ImmunoResearch) durante 20 minutos. A continuación se bloquea la reacción durante 20 minutos con IgG de ratón (Molecular Probes), seguido de una incubación de 30 minutos con Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes). Finalmente se incuban las células con anti-LAMP1 de ratón marcado con Zenon Alexa488 (BD Pharmingen), un marcador tanto para lisosomas como para MIIC (un comportamiento de tipo lisosoma que es parte de una ruta de MHC de clase II), durante 20 minutos, y se post-fija con PFA al 3%. Se resuspenden las células en 20 µl de tampón de saponina y se permite que se adhieran a portaobjetos cubiertos de poli-lisina (Sigma) antes de montar sobre un cubreobjetos con VectaShield que contiene DAPI (Vector Laboratories). Para la inmunofluorescencia de MIIC o los lisosomas, se fijan las células, se permeabilizan y se mejoran como anteriormente, a continuación se co-tiñen con Alexa555-HLA-DM marcado con Zenon (BD Pharmingen) y Alexa488-Lamp1 en presencia exceso de IgG de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes).

[0831] Por lo tanto, la colocalización de anticuerpos “humanizados” injertados con 2F2 o variantes de anticuerpo con MHC o lisosomas de líneas celulares B tal y como se evalúa mediante inmunofluorescencia puede indicar las moléculas que son agentes excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como los linfomas (es decir, linfomas no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), y otros cánceres de células hematopoyéticas.

45 EJEMPLO 5: Preparación de anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas

[0832] La preparación de los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas se realizó tal y como se describe en el presente documento.

[0833] Se puede mutagenizar el ADN que codifica el anticuerpo ch2F2 (cadena ligera, SEQ ID No: 4, figura 4; y cadena pesada, SEQ ID No: 5, figura 5), mediante procedimientos descritos en el presente documento para modificar la cadena ligera y la cadena pesada.

[0834] Se mutagenizó el ADN que codifica el anticuerpo hu2F2.D7 (cadena pesada, SEQ ID No: 90) y la cadena ligera (SEQ ID No. 89) (figura 13) mediante procedimientos descritos en el presente documento para modificar la cadena pesada. También puede mutagenizarse el ADN que codifica el anticuerpo hu2F2.D7 (cadena pesada, (SEQ ID No: 90); Figura 13) mediante procedimientos descritos en el presente documento para modificar la región Fc de la cadena pesada.

[0835] En la preparación de los anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas, se mutagenizó el ADN que codifica la cadena ligera para sustituir la cisteína por valina en la posición 205 de Kabat en la cadena ligera (posición secuencial 210) tal y como se muestra en la Figura 18 (cadena ligera SEQ ID N°: 88 de tioMAb hu2F2.D7). Se ha mutagenizado el ADN que codifica la cadena pesada para sustituir cisteína por alanina en la posición 118 de EU en la cadena pesada (posición secuencial 118; número de Kabat 114) tal y como se muestra en la figura 17 (cadena pesada SEQ ID No: 85 de anticuerpo tioMAb hu2F2.D7). Puede mutagenizarse la región Fc de anticuerpos anti-CD79b para sustituir cisteína por serina en la posición 400 de EU en la región Fc de la cadena pesada (posición secuencial 400; número de Kabat 396) tal y como se muestra en la Tabla 2-3.

A. Preparación de anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas por conjugación y reoxidación

[0836] Los anticuerpos monoclonales anti-CD79b modificados con cisteínas y de longitud completa se expresaron en células CHO y se purificaron en una cromatografía de afinidad de proteína A seguida por una cromatografía de exclusión de tamaño. Se reconstituyen los anticuerpos petrificados en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM en aproximadamente pH 8,0 y se redujo con un exceso molar de aproximadamente 50-100 veces de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante aproximadamente 1-2 horas a 37°C. Se diluye el TioMab reducido y se carga en una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contenía cloruro sódico 0,3M. Se trata el TioMab reducido y eluido con 2 mM de ácido deshidroascórbico (dhAA) en pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre acuoso 2 mM (CuSO₄) a temperatura ambiente toda la noche. También puede ser efectiva la oxidación con aire ambiental. Se intercambia el tampón mediante elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1mM. Se estima el valor de tío/Ab mediante la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tío mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

EJEMPLO 6: Preparación de fármaco y anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas, conjugación mediante la conjugación de anticuerpos anti-CD79b modificados con cisteínas e intermedios de enlazador de fármaco

[0837] Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 5, el anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas se reconstituye en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se enfrió en hielo. Se disuelven en DMSO aproximadamente 1,5 equivalentes molares en relación con cisteínas diseñadas por anticuerpo de un intermedio enlazador de fármaco de auristatina, como MC-MMAE (maleimidocaproilmonometil auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE, o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional reactivo de tío como el maleimido, se diluye en acetonitrilo y agua, y se añade al anticuerpo reoxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se adiciona un exceso de maleimido para detener la reacción y bloquear cualquier grupo tío de anticuerpo sin reaccionar. Se concentra la mezcla de reacción mediante ultrafiltración centrífuga y se purifica el conjugado de fármaco y anticuerpo anti-CD79b modificado con cisteínas y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm bajo condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

[0838] La preparación de tíoMab hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1 se realizó tal y como se indica a continuación. Se modifica la cisteína libre en tíoMab hu2F2.D7-HC(A118C) mediante el reactivo de bis-maleimido BM(PEO)3 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido sin reaccionar sobre la superficie del anticuerpo. Esto se lleva a cabo mediante la disolución de BM(PEO)3 en una mezcla al 50% de etanol/agua a una concentración de 10 mM y la adición de un exceso molar de diez veces de BM(PEO)3 a una solución que contenía tíoMab hu2F2.D7-HC(A118C) en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y se deja reaccionar durante 1 hora. Se elimina el exceso de BM(PEO)3 mediante filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6 con tampón de NaCl 150 mM. Se añade un exceso molar de DM1 de aproximadamente 10 veces disuelto en dimetil acetamida (DMA) al intermedio tíoMab hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO. También puede emplearse dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo del grupo farmacológico. Se deja que la mezcla de reacción reaccione durante toda la noche antes de la filtración en gel o la diálisis en PBS para eliminar el fármaco sin reaccionar. Se utiliza la filtración en gel en columnas S200 en PBS para eliminar agregados de alto peso molecular y suministrar tíoMab hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1 purificado.

[0839] Mediante los mismos protocolos, se pueden generar el tío hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 de control, el tío hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF de control, el tío hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE de control y el tío anti-CD22-HC (A118C)-MC-MMAF de control.

[0840] Mediante los procedimientos anteriores, se pueden preparar y analizar, por ejemplo, pero sin ser limitativos, los siguientes conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD79b modificados con cisteína (TDCs):

1. tío hu2F2.D7-HC(A118C)-MC-MMAF mediante la conjugación de tío hu2F2.D7-HC(A118C) A118C y MC-MMAF;
2. tío hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1 mediante la conjugación de tío hu2F2.D7-HC(A118C) A118C y BMPEO-DM1;
3. tío hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE mediante la conjugación de tío hu2F2.D7-HC(A118C) A118C y MC-val-cit-PAB-MMAE;
4. tío ch2F2-HC(A118C)-MC-MMAF mediante la conjugación de tío ch2F2-HC(A118C) y MC-MMAF; y
5. tío ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF mediante conjugación de tío ch2F2-LC(V205C) y MC-MMAF.

EJEMPLO 7: Caracterización de la afinidad de unión de conjugados de fármaco y TioMab modificado con cisteínas a antígeno de superficie celular

[0841] Se determina mediante análisis FACS la afinidad de unión de conjugados de fármaco y tío hu2F2.D7 y conjugados de fármaco y tío ch2F2 a CD79b expresado en células BJAB con luciferasa.

[0842] Brevemente, se ponen en contacto aproximadamente 1×10^6 células en 100 μl con cantidades variables (1,0 μg , 0,1 μg o 0,01 μg de Ab por millón de células de las células BJAB con luciferasa) de uno de los siguientes, pero sin limitación, conjugados de fármaco y tioMab anti-CD79b o desnudo (Ab sin conjugar como control): (1) tio ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF o (2) tio ch2F2-HC(A118C)-MC-MMAF; (3) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (4) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1, o (5) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MC-MMAF. Se utiliza Ig anti-humano de ratón conjugado con PE como el anticuerpo de detección secundaria (BD Cat#555787).

[0843] Se detecta la unión de anticuerpo anti-CD79b a la superficie celular utilizando Ig anti-humano de ratón conjugado con PE.

EJEMPLO 8: Ensayo para la reducción de la proliferación celular in vitro mediante conjugados de fármaco y tioMab anti-CD79b

[0844] Se mide la potencia *in vitro* de los conjugados de fármaco y TioMab anti-CD79b (incluyendo, pero sin limitación, tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCMMAF, tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE y tio hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1), mediante un ensayo de proliferación celular (por ejemplo, en células BJAB con luciferasa, Granta-519, WSU-DLCL2). El Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® es un procedimiento de ensayo homogéneo disponible comercialmente (Promega Corp., Madison, WI) que se basa en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (US 5583024; US 5674713; US 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo en base a la cuantificación del ATP presente, un indicador de células activas metabólicamente (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993); US 6602677). Se realiza el Ensayo CellTiter-Glo® en un formato de 96 pocillos, disponiéndolo para el cribado con un alto rendimiento automatizado (HTS) (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995)). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo único (Reactivo de CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero.

[0845] El formato “añadir-mezcla-measttre” homogéneo provoca la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a las cantidades de ATP presente. El sustrato, Luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente mediante la luciferasa de luciérnaga recombinante con la conversión de ATP en AMP y la generación de fotones. Las células viables se reflejan en unidades luminiscentes relativas (RLU). Pueden registrarse datos mediante luminómetro o dispositivo de imagen de cámara CCD. La producción luminiscente se presenta como RLU, medido a lo largo del tiempo. %RLU es el porcentaje de RLU normalizado en comparación con un control de “conjugado sin fármaco”. Alternativamente, pueden contarse los fotones de la luminiscencia en un contador de centelleo en presencia de un centelleante. Entonces las unidades de luz pueden representarse como CPS (recuento por segundo).

[0846] Se midió la eficacia de conjugados de tioMab-fármaco mediante un ensayo de proliferación celular empleando el siguiente protocolo, adaptado de CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)):

1. En una placa de pared opaca de 384 pocillos, se depositó en cada pocillo una alícuota de 40 μl de cultivo celular que contenía aproximadamente 3000 células de BJAB, Granta-519 o WSU-DLCL2 en medio.
2. Se adicionó TDC (Conjugado de Fármaco y TioMab) (10 μl) a pocillos experimentales por cuadruplicado en una concentración final de 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 o 1,5 ng/mL, con los pocillos de control de “conjugado sin fármaco” recibiendo tan sólo medio, y se incubó durante 3 días.
3. Se equilibraron las placas a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
4. Se adicionó Reactivo de CellTiter-Glo (50 μl).
5. Se mezclaron los contenidos durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir lisis celular.
6. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
7. Se registró la luminiscencia y se recogió en gráficos como %RLU (unidades de luminiscencia relativa).

Se representaron los datos de las células incubadas con medio sin conjugado de fármaco a 0,51 ng/ml. Medios: células BJAB, Granta-519 y WSU-DLCL2 crecen en RPM11640/10%FBS/2 mM glutamina.

EJEMPLO 9: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo mediante conjugados de fármaco y TioMab anti-CD79b

[0847] En un estudio similar, utilizando el mismo protocolo de estudio de xenoinjerto tal y como se describe en el Ejemplo 3 (ver anteriormente), variando los conjugados de fármaco y las dosis administradas, se estudia la eficacia de los conjugados de fármaco y tioMab en la reducción del volumen de tumores de células B en modelos de xenoinjerto, por ejemplo, xenoinjertos de Granta-519 (linfoma de células de manto humano), xenoinjertos de DOHH2 (linfoma folicular), xenoinjertos de WSU-DLCL2 (linfoma difuso de células grandes) o xenoinjertos de BJAB (linfoma de Burkitt).

[0848] La memoria escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la materia lleve a cabo la presente invención. El depósito de material del presente documento no constituye la admisión de que la descripción escrita aquí contenida es inadecuada para permitir llevar a cabo cualquiera de los aspectos de la presente invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni debe interpretarse que se limita el alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, varias modificaciones de la presente invención, además de las mostradas y descritas aquí, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

Listado de secuencias

10 **[0849]**

<110> Genentech, Inc.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD79B HUMANIZADOS E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO

15

<130> P5111R1WO

<141> 2007-10-19

20

<150> US 60/950,088

<151> 2007-07-16

<160> 122

25

<210> 1

<211> 1270

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50

tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100

35

aggctggcgt tgtctcctgt gccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150

gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200

40

ggaatcccaa aggtagtgtgct tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250

atagccagga aacggggcctt cacggtgaaa atgactgct acatgaacag 300

cgctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350

45

cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaaagatc ccagaacgaa 400

tctctcgcca ccctcacat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450

50

ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcggaggtc taccagggct 500

gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcacctggc acagctgaag 550

cagaggaaca cgctgaagga tggatcatc atgatccaga cgctgctgat 600

55

catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650

gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgaggcct ggacattgac 700

60

cagacagcca cctatgagga catagtgacg ctgcggacag gggaagtga 750

gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800

tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850

65

gctcatggcc caacccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900

gcccaccaga gctgccatth gtctccagcc cctggtcccc agctcttgcc 950

70

aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000

ctggggatgg acgggacca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050

ccccacacat gggatggggg aggcagagac tgggtccagag cccgcaaatg 1100

ES 2 528 922 T3

gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150
aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200
5 tcccaccca gggaggcctt ggctccagt gccttcccc gtggaataaa 1250
cgggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2
10 <211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
15 Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val
1 5 10 15
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg
20 20 25 30
Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg
25 35 40 45
Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
25 50 55 60
Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser
65 70 75
30 Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys
80 85 90
Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala
35 95 100 105
Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr
110 115 120
40 Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly
125 130 135
Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln
140 145 150
45 Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln
155 160 165
Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu
50 170 175 180
Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr
185 190 195
55 Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
200 205 210
Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His
215 220 225
60 Pro Gly Gln Glu

<210> 3
65 <211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
70 <223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena ligera

<400> 3
gatatcgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccatggaca 50
accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100
75 gaaagacata tttgaattgg ttattacaga ggccaggcca gtctccagag 150

ES 2 528 922 T3

cgctaattt atctggtgtc taaactggat tctggagtcc ctgacaggtt 200
 5 cactggcagt ggatcagggg cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250
 aggtctgagga tttgggagtt tattgttgct ggcaaggtag acattttccg 300
 tacacgttcg gagggggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 350
 10 accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 400
 ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 450
 gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag 500
 15 tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 550
 tgacgctgag caagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 20 gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 650
 agagtgt 657

25 <210> 4
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena ligera

<400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
 1 5 10 15
 35 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 40 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 45 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 50 Tyr Cys Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 95 100 105
 55 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 110 115 120
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 125 130 135
 60 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 140 145 150
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 155 160 165
 65 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 170 175 180
 70 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 185 190 195
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210
 75 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

ES 2 528 922 T3

```

<210> 5
<211> 1329
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena pesada

10 <400> 5
   caggttcaac tccagcaacc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc 50
   agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga 100
15   tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgaatg gattggtatg 150
   attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcatatct tcaaggacia 200
20   ggccactttg actgtagaca aatcctccag cacagcctac ttgcagctca 250
   gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaaatctc 300
   tacttgtggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctccttag cctccaccaa 350
25   gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc acctctgggg 400
   gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 450
   acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc 500
30   ggctgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgactg 550
   tgccctctag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600
35   aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagcca aatcttgtga 650
   caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 700
40   cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacacct catgatctcc 750
   cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacct 800
   tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca 850
45   agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 900
   gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg 950
50   caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1000
   aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1050
   cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg 1100
55   cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg 1150
   agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
60   ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa 1250
   cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc 1300
   agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1329

65 <210> 6
   <211> 442
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

70 <220>
   <223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena pesada

   <400> 6
75   Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
      1           5           10           15

```

ES 2 528 922 T3

	Ala	Ser	Val	Lys	Leu 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr 30
5	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn 35	Trp	Val	Lys	Gln	Arg 40	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu 45
	Glu	Trp	Ile	Gly	Met 50	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp 55	Ser	Glu	Thr	His	Tyr 60
10	Asn	His	Ile	Phe	Lys 65	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu 70	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 75
	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr 80	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90
15	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu 100	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln 105
	Gly	Thr	Ser	Val	Thr 110	Val	Ser	Leu	Ala	Ser 115	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser 120
20	Val	Phe	Pro	Leu	Ala 125	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser 130	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr 135
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys 140	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr 145	Phe	Pro	Glu	Pro	Val 150
25	Thr	Val	Ser	Trp	Asn 155	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr 160	Ser	Gly	Val	His	Thr 165
30	Phe	Pro	Ala	Val	Leu 170	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu 175	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 180
	Val	Val	Thr	Val	Pro 185	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly 190	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile 195
35	Cys	Asn	Val	Asn	His 200	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr 205	Lys	Val	Asp	Lys	Lys 210
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser 215	Cys	Asp	Lys	Thr	His 220	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys 225
40	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu 230	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 235	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 240
45	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 245	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 250	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 255
	Thr	Cys	Val	Val	Val 260	Asp	Val	Ser	His	Glu 265	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 270
50	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 275	Asp	Gly	Val	Glu	Val 280	His	Asn	Ala	Lys	Thr 285
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 290	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr 295	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 300
55	Val	Leu	Thr	Val	Leu 305	His	Gln	Asp	Trp	Leu 310	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 315
60	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 320	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 325	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 330
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 335	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 340	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 345
65	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 350	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 355	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 360
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 365	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 370	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 375
70	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 380	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 385	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 390
75	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys

ES 2 528 922 T3

395 400 405
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 410 415 420
 5 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 425 430 435
 10 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440
 <210> 7
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Ser Ser His Trp Leu Val
 1 5 10 15
 20 Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala
 20 25 30
 Lys Ser Glu Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
 35 40 45
 Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe
 50 55 60
 30 Thr Val Lys Met His Cys Tyr Val Thr Asn Ser Thr Phe Ser Ile
 65 70 75
 Val Ser Trp Leu Arg Lys Arg Glu Thr Asp Lys Glu Pro Gln Gln
 80 85 90
 35 Val Asn Leu Glu Gln Gly His Met His Gln Thr Gln Asn Ser Ser
 95 100 105
 40 Val Thr Thr Leu Ile Ile Gln Asp Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly
 110 115 120
 Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Glu Cys Ser Lys Thr Ser Glu Val Tyr
 125 130 135
 45 Arg Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu
 140 145 150
 Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met
 155 160 165
 50 Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
 170 175 180
 55 Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Ala Asp
 185 190 195
 His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
 200 205 210
 60 Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly
 215 220 225
 Glu His Pro Gly Gln Glu
 230
 65 <210> 8
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 70 <400> 8
 Met Ala Thr Leu Val Leu Ser Ser Met Pro Cys His Trp Leu Leu
 1 5 10 15
 75 Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ser Gly Glu Pro Val Pro Ala Met Thr
 20 25 30

ES 2 528 922 T3

Ser Ser Asp Leu Pro₃₅ Leu Asn Phe Gln Gly₄₀ Ser Pro Cys Ser Gln₄₅
 5 Ile Trp Gln His Pro₅₀ Arg Phe Ala Ala Lys₅₅ Lys Arg Ser Ser Met₆₀
 Val Lys Phe His Cys₆₅ Tyr Thr Asn His Ser₇₀ Gly Ala Leu Thr Trp₇₅
 10 Phe Arg Lys Arg Gly₈₀ Ser Gln Gln Pro Gln₈₅ Glu Leu Val Ser Glu₉₀
 15 Glu Gly Arg Ile Val₉₅ Gln Thr Gln Asn Gly₁₀₀ Ser Val Tyr Thr Leu₁₀₅
 Thr Ile Gln Asn Ile₁₁₀ Gln Tyr Glu Asp Asn₁₁₅ Gly Ile Tyr Phe Cys₁₂₀
 20 Lys Gln Lys Cys Asp₁₂₅ Ser Ala Asn His Asn₁₃₀ Val Thr Asp Ser Cys₁₃₅
 Gly Thr Glu Leu Leu₁₄₀ Val Leu Gly Phe Ser₁₄₅ Thr Leu Asp Gln Leu₁₅₀
 25 Lys Arg Arg Asn Thr₁₅₅ Leu Lys Asp Gly Ile₁₆₀ Ile Leu Ile Gln Thr₁₆₅
 30 Leu Leu Ile Ile Leu₁₇₀ Phe Ile Ile Val Pro₁₇₅ Ile Phe Leu Leu Leu₁₈₀
 Asp Lys Asp Asp Gly₁₈₅ Lys Ala Gly Met Glu₁₉₀ Glu Asp His Thr Tyr₁₉₅
 35 Glu Gly Leu Asn Ile₂₀₀ Asp Gln Thr Ala Thr₂₀₅ Tyr Glu Asp Ile Val₂₁₀
 Thr Leu Arg Thr Gly₂₁₅ Glu Val Lys Trp Ser₂₂₀ Val Gly Glu His Pro₂₂₅
 40 Gly Gln Glu
 <210> 9
 45 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 50 Asp Ile Gln Met Thr₅ Gln Ser Pro Ser Ser₁₀ Leu Ser Ala Ser Val₁₅
 Gly Asp Arg Val Thr₂₀ Ile Thr Cys Arg Ala₂₅ Ser Gln Ser Ile Ser₃₀
 55 Asn Tyr Leu Ala Trp₃₅ Tyr Gln Gln Lys Pro₄₀ Gly Lys Ala Pro Lys₄₅
 60 Leu Leu Ile Tyr Ala₅₀ Ala Ser Ser Leu Glu₅₅ Ser Gly Val Pro Ser₆₀
 Arg Phe Ser Gly Ser₆₅ Gly Ser Gly Thr Asp₇₀ Phe Thr Leu Thr Ile₇₅
 65 Ser Ser Leu Gln Pro₈₀ Glu Asp Phe Ala Thr₈₅ Tyr Tyr Cys Gln Gln₉₀
 Tyr Asn Ser Leu Pro₉₅ Trp Thr Phe Gly Gln₁₀₀ Gly Thr Lys Val Glu₁₀₅
 70 Ile Lys Arg
 <210> 10
 75 <211> 113
 <212> PRT

ES 2 528 922 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera de hu2F2 quimérico

5 <400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

10 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

15 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
35 40 45

20 Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

25 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

30 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

35 Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera de injerto de anticuerpo humanizado (injerto de hu2F2)

45 <400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

50 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

55 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

60 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

65 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

70 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

75 Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

80 <220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

85 <400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

ES 2 528 922 T3

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 5 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 10 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 15 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 20 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110
 <210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 30 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 35 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 40 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 45 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 50 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110
 <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio variable de la cadena pesada de 2F2 quimérico
 60 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 65 Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 35 40 45
 70 Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
 50 55 60
 Asn His Ile Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 75 Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

ES 2 528 922 T3

80 85 90
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
 95 100 105
 5 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Leu
 110
 <210> 15
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio variable de la cadena pesada de injerto de anticuerpo humanizado
 (injerto de hu2F2)
 <400> 15
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 25 Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
 50 55 60
 30 Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 35 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
 95 100 105
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110
 <210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 50 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 55 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 60 Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
 50 55 60
 65 Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 70 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
 95 100 105
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110
 75 <210> 17

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> HVR-L3 (parcial) de variante de anticuerpo humanizado (injerto de hu2F2)
 <400> 17
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
 10 5
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Variante de anticuerpo humanizado (mutación HVR-L3)
 20 <400> 18
 Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe
 5
 <210> 19
 25 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> FR1 - LC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 35 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 20
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> FR2 - LC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 20
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 50 <210> 21
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> FR3 - LC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 21
 60 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 65 20 25 30
 Tyr Cys
 <210> 22
 70 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 75 <223> FR4 - LC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

ES 2 528 922 T3

<210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> FR1 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 27
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 15
 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> FR2 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 28
 25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> FR3 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 35
 <400> 29
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 40 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> FR4 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 50
 <400> 30
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10
 55
 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> HVR1 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 <400> 31
 65 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
 5 10

 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 70
 <220>
 <223> HVR2 - HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
 75
 <400> 32
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn His Ile

ES 2 528 922 T3

1 5 10 15
Phe Lys Asp
5
<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> HVR3-HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
15
<400> 33
Ala Arg Asn Leu Tyr Leu
5
20
<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> CH1 de HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
30
<400> 34
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15
35
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60
40
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90
45
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105
Thr His Thr
50
<210> 35
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
55
<220>
<223> Fc de HC de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)
60
<400> 35
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
1 5 10 15
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30
65
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45
70
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75
75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
80 85 90

ES 2 528 922 T3

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 95 100 105
 5 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 110 115 120
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 125 130 135
 10 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 140 145 150
 15 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 155 160 165
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 170 175 180
 20 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 185 190 195
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 200 205 210
 25 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 215 220
 30 <210> 36
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 35 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 40 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg
 35 40 45
 Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 50 55 60
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 50 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 55 <210> 37
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 60 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 65 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 70 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 75 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

ES 2 528 922 T3

<210> 38
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 10 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 15 35 40 45
 15 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 20 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80
 25 <210> 39
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45
 40 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 45 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 65 70 75
 Thr Val Ser Ser
 50 <210> 40
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 40
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30
 60 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
 35 40 45
 65 Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 70 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 75 <210> 41
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 528 922 T3

<400> 41
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 5 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 10 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 15 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80
 20
 <210> 42
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 42
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 30 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 35 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 40 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80
 45
 <210> 43
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 43
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 55 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 60 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 50 55 60
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 65 70 75
 Thr Val Ser Ser
 70
 <210> 44
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 75
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

ES 2 528 922 T3

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 5 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 50 55 60
 10 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 <210> 45
 <211> 81
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 35 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80
 40 <210> 46
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 50 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 55 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 60 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75
 Val Thr Val Ser Ser
 80
 65 <210> 47
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 70 <400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 75 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

ES 2 528 922 T3

Pro Gly Lys Gly Leu₃₅ Glu Trp Val Arg Phe₄₀ Thr Ile Ser Arg Asp₄₅
 5 Asn Ser Lys Asn Thr₅₀ Leu Tyr Leu Gln Met₅₅ Asn Ser Leu Arg Ala₆₀
 Glu Asp Thr Ala Val₆₅ Tyr Tyr Cys Trp Gly₇₀ Gln Gly Thr Leu Val₇₅
 10 Thr Val Ser Ser
 <210> 48
 <211> 87
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 20 Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅
 Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Asn Ile Lys₃₀
 25 Trp Val Arg Gln Ala₃₅ Pro Gly Lys Gly Leu₄₀ Glu Trp Val Ser Arg₄₅
 Phe Thr Ile Ser Ala₅₀ Asp Thr Ser Lys Asn₅₅ Thr Ala Tyr Leu Gln₆₀
 30 Met Asn Ser Leu Arg₆₅ Ala Glu Asp Thr Ala₇₀ Val Tyr Tyr Cys Ser₇₅
 35 Arg Trp Gly Gln Gly₈₀ Thr Leu Val Thr Val₈₅ Ser Ser
 <210> 49
 <211> 81
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 45 Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅
 Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Trp Val Arg Gln Ala₃₀
 50 Pro Gly Lys Gly Leu₃₅ Glu Trp Val Arg Phe₄₀ Thr Ile Ser Ala Asp₄₅
 Thr Ser Lys Asn Thr₅₀ Ala Tyr Leu Gln Met₅₅ Asn Ser Leu Arg Ala₆₀
 55 Glu Asp Thr Ala Val₆₅ Tyr Tyr Cys Ser Arg₇₀ Trp Gly Gln Gly Thr₇₅
 Leu Val Thr Val Ser Ser₈₀
 60 <210> 50
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅
 70 Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Trp Val Arg Gln Ala₃₀
 Pro Gly Lys Gly Leu₃₅ Glu Trp Val Arg Phe₄₀ Thr Ile Ser Ala Asp₄₅
 75 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

ES 2 528 922 T3

		50		55		60									
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
					65					70					75
5	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
					80										
10	<210>	51													
	<211>	87													
	<212>	PRT													
	<213>	Homo sapiens													
15	<400>	51													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
					20					25					30
20	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg
					35					40					45
25	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
					50					55					60
	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					65					70					75
30	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
					80					85					
35	<210>	52													
	<211>	81													
	<212>	PRT													
	<213>	Homo sapiens													
40	<400>	52													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
					20					25					30
45	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp
					35					40					45
	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
					50					55					60
50	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					65					70					75
55	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
					80										
60	<210>	53													
	<211>	80													
	<212>	PRT													
	<213>	Homo sapiens													
65	<400>	53													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1				5					10					15
	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
					20					25					30
70	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp
					35					40					45
	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
					50					55					60
75	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
					65					70					75

ES 2 528 922 T3

Val Thr Val Ser Ser
80

5 <210> 54
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 54
Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅

15 Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Trp Val Arg Gln Ala₃₀

Pro Gly Lys Gly Leu₃₅ Glu Trp Val Arg Phe₄₀ Thr Ile Ser Ala Asp₄₅

20 Thr Ser Lys Asn Thr₅₀ Ala Tyr Leu Gln Met₅₅ Asn Ser Leu Arg Ala₆₀

25 Glu Asp Thr Ala Val₆₅ Tyr Tyr Cys Trp Gly₇₀ Gln Gly Thr Leu Val₇₅

Thr Val Ser Ser

30 <210> 55
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 55
Asp Ile Gln Met Thr₅ Gln Ser Pro Ser Ser₁₀ Leu Ser Ala Ser Val₁₅

40 Gly Asp Arg Val Thr₂₀ Ile Thr Cys Trp Tyr₂₅ Gln Gln Lys Pro Gly₃₀

Lys Ala Pro Lys Leu₃₅ Leu Ile Tyr Gly Val₄₀ Pro Ser Arg Phe Ser₄₅

45 Gly Ser Gly Ser Gly₅₀ Thr Asp Phe Thr Leu₅₅ Thr Ile Ser Ser Leu₆₀

Gln Pro Glu Asp Phe₆₅ Ala Thr Tyr Tyr Cys₇₀ Phe Gly Gln Gly Thr₇₅

50 Lys Val Glu Ile Lys₈₀

55 <210> 56
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <400> 56
Asp Ile Val Met Thr₅ Gln Ser Pro Leu Ser₁₀ Leu Pro Val Thr Pro₁₅

Gly Glu Pro Ala Ser₂₀ Ile Ser Cys Trp Tyr₂₅ Leu Gln Lys Pro Gly₃₀

65 Gln Ser Pro Gln Leu₃₅ Leu Ile Tyr Gly Val₄₀ Pro Asp Arg Phe Ser₄₅

Gly Ser Gly Ser Gly₅₀ Thr Asp Phe Thr Leu₅₅ Lys Ile Ser Arg Val₆₀

70 Glu Ala Glu Asp Val₆₅ Gly Val Tyr Tyr Cys₇₀ Phe Gly Gln Gly Thr₇₅

75 Lys Val Glu Ile Lys₈₀

ES 2 528 922 T3

<210> 57
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 57
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 10 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 15 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 50 55 60
 20 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Lys Val Glu Ile Lys
 80
 25 <210> 58
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 58
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 35 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45
 40 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 45 Lys Val Glu Ile Lys
 80
 50 <210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> HVR1-LC de injerto de hu2F2
 <400> 59
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 60 Asn
 65 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 70 <220>
 <223> HVR2-LC de injerto de hu2F2
 <400> 60
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 5
 75 <210> 61
 <211> 9

ES 2 528 922 T3

1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 5 Tyr Cys
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 15 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10
 <210> 69
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 30 <210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 35 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10
 <210> 71
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 45 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 50 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 55 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10
 60 <210> 73
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Xaa = A or R
 <400> 73
 70 Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 75 <210> 74

ES 2 528 922 T3

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 74
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 20 25 30
 Ala
 15 <210> 75
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 75
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 25 20 25 30
 Ala Arg
 30 <210> 76
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 76
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 20 25 30
 Ser
 45 <210> 77
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 77
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 55 20 25 30
 Ser Arg
 60 <210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Péptido que contiene epítipo
 <400> 78
 Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys
 70 1 5 10 15
 Lys
 75 <210> 79
 <211> 9

ES 2 528 922 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> HVR-L3 de variante de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 79
 Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
 5

10 <210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido de union a albúmina

<400> 80
 20 Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
 1 5 10 15
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
 20 25 30

25 <210> 81
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido de union a albúmina

<400> 81
 35 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Trp Glu Asp Asp Phe
 20

40 <210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido de union a albúmina

<400> 82
 50 Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Trp Glu Asp Asp Phe
 20

55 <210> 83
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido de union a albúmina

<400> 83
 65 Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15
 Glu Asp Asp

70 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

75 <220>

ES 2 528 922 T3

<223> Péptido de union a albúmina

<400> 84

5 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 85

<211> 442

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante Tio anti-CD79b (hu2F2.D7)-HC(A118C) - HC

15 <400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
20 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
25 Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60
Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
30 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
35 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser
110 115 120
40 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
125 130 135
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
140 145 150
45 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
155 160 165
50 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
170 175 180
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
185 190 195
55 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
200 205 210
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
215 220 225
60 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
230 235 240
65 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
70 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
75 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

ES 2 528 922 T3

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210

5 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 87
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Variante Tio anti-DC79b (hu2F2.D7)-LC(V205C) -HC

15 <400> 87
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

25 Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
 50 55 60

30 Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

35 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 110 115 120

40 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 125 130 135

45 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 140 145 150

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 155 160 165

50 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 170 175 180

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 185 190 195

55 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 200 205 210

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 215 220 225

60 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 230 235 240

65 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

70 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

ES 2 528 922 T3

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315
 5 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 320 325 330
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 335 340 345
 10 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 350 355 360
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 365 370 375
 15 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 380 385 390
 20 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 395 400 405
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 410 415 420
 25 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 425 430 435
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440
 30
 <210> 88
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Variante Tio anti-CD79b(hu2F2.D7)-LC(V205C)-LC
 40
 <400> 88
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 45 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 50 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 55 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 60 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 110 115 120
 65 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 125 130 135
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 140 145 150
 70 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 155 160 165
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 170 175 180
 75 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

ES 2 528 922 T3

185 190 195
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
 200 205 210
 5 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215
 <210> 89
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera del anticuerpo hu2F2.D7
 <400> 89
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 20 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 35 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 40 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 110 115 120
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 125 130 135
 45 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 140 145 150
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 155 160 165
 50 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 170 175 180
 55 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 185 190 195
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210
 60 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215
 <210> 90
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada del anticuerpo hu2F2.D7
 <400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 75 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

ES 2 528 922 T3

	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45
5	Glu	Trp	Val	Gly	Met 50	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp 55	Ser	Glu	Thr	His	Tyr 60
	Asn	His	Ile	Phe	Lys 65	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser 75
10	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr 80	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu 100	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln 105
15	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 110	Val	Ser	Ser	Ala	Ser 115	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser 120
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala 125	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser 130	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr 135
20	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys 140	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr 145	Phe	Pro	Glu	Pro	Val 150
25	Thr	Val	Ser	Trp	Asn 155	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr 160	Ser	Gly	Val	His	Thr 165
	Phe	Pro	Ala	Val	Leu 170	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu 175	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 180
30	Val	Val	Thr	Val	Pro 185	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly 190	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile 195
	Cys	Asn	Val	Asn	His 200	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr 205	Lys	Val	Asp	Lys	Lys 210
35	Val	Glu	Pro	Lys	Ser 215	Cys	Asp	Lys	Thr	His 220	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys 225
40	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu 230	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 235	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 240
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 245	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 250	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 255
45	Thr	Cys	Val	Val	Val 260	Asp	Val	Ser	His	Glu 265	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 270
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 275	Asp	Gly	Val	Glu	Val 280	His	Asn	Ala	Lys	Thr 285
50	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 290	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr 295	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 300
55	Val	Leu	Thr	Val	Leu 305	His	Gln	Asp	Trp	Leu 310	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 315
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 320	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 325	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 330
60	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 335	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 340	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 345
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 350	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 355	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 360
65	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 365	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 370	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 375
70	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 380	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 385	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 390
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp 395	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 400	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 405
75															

ES 2 528 922 T3

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 410 415 420
 5 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 425 430 435
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440
 10 <210> 91
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Variante Tio-hu2F2-HC
 <400> 91
 20 Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
 5 10
 <210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Variante de tio-hu2F2-HC
 30 <400> 92
 Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
 5 10
 <210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Variante de tio-hu2F2-HC
 40 <400> 93
 Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
 5 10
 45 <210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Variante de tio-hu2F2-HC
 <400> 94
 55 Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
 5 10
 <210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Variante de tio-hu2F2-HC
 65 <400> 95
 Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
 5 10
 70 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 75 <220>
 <223> Variante de tio-hu2F2-HC

ES 2 528 922 T3

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de tio-anti-CD79b (2chF2)-LC

10 <400> 122
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-CD79b que comprende las siguientes secuencias de regiones hipervariables (HVR):
 5 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A16, en la que A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 23)
 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es LVS KLDS (SEQ ID NO: 24)
 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es FQGTHFPFT (SEQ ID NO: 25)
 (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 31)
 (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 32)
 10 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, en la que F1-F6 es ARNLYL (SEQ ID NO: 33).
 en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo monoclonal que comprende los dominios variables de SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 14, y/o el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal generado a partir del hibridoma con el número de acceso ATCC PTA-7712, y/o un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables del anticuerpo generado a partir del hibridoma con el número de acceso ATCC PTA-7712.
- 15 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, cuyo anticuerpo se une a un epítipo en una región de CD79b de los aminoácidos 29-39 de la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 1-11 de la SEQ ID NO: 78.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es (i) un anticuerpo monoclonal; (ii) un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un fragmento Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv o F(ab')₂, y/o (iii) un anticuerpo quimérico o humanizado, opcionalmente un anticuerpo monovalente o bivalente, que comprende opcionalmente una única región Fab unida a una región Fc.
- 20 4. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 3(iii) en el que la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b humano es
 25 (a) 3 nM o mejor; o
 (b) sustancialmente la misma que o por lo menos 1, 2 ó 3 veces superior a la afinidad de un anticuerpo murino o quimérico que comprende una secuencia variable de cadena ligera y cadena pesada representada en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14 en su forma bivalente;
 en el que la afinidad de unión está opcionalmente expresada como un valor K_d y en el que la afinidad de unión se mide opcionalmente mediante Biacore, radioinmunoensayo o ELISA.
- 30 5. Anticuerpo humanizado, según la reivindicación 3(iii) o la reivindicación 4, que comprende la secuencia de armazón de consenso kappa subgrupo I humana de cadena ligera y/o la secuencia armazón de consenso de subgrupo III humana de cadena pesada.
- 35 6. Anticuerpo según la reivindicación 5, en el que
 (i) la secuencia de armazón de cadena pesada comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78, opcionalmente R71A, N73T y/o L78A; y/o
 40 (ii) la secuencia de armazón de cadena ligera comprende una o más de FR1-LC de SEQ ID No. 19, FR1-LC de SEQ ID No. 20, FR3-LC de SEQ ID No. 21 y FR4-LC de SEQ ID No. 22 y/o la secuencia de armazón de cadena pesada comprende una o más de FR1-HC de SEQ ID No. 27, FR2-HC de SEQ ID No. 28 y FR3-HC de SEQ ID No. 29 y FR4-HC de SEQ ID No. 30; y/o
 (iii) el anticuerpo comprende además la secuencia de CL1, CH1 y/o Fc mostrada en la figura 13 (SEQ ID NO: 26, 34 y/o 35); y/o
 45 (iv) el anticuerpo comprende (a) la secuencia de cadena ligera mostrada en la SEQ ID No. 89, y (b) la secuencia de cadena pesada mostrada en la SEQ ID No. 90.
7. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un anticuerpo modificado con cisteínas que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre, en el que uno o más de los residuos de cisteína libre están situados opcionalmente en una o más posiciones seleccionadas entre 15, 110, 114, 121, 127, 168 y 205 de la cadena ligera según la convención de numeración de Kabat y 5, 23, 84, 112 de la cadena pesada según la convención de numeración de Kabat y 118, 120, 282, 375 y 400 de la cadena pesada según la convención de numeración EU, en el que opcionalmente dicho uno o más aminoácidos de cisteína libre tienen un valor de reactividad tio en el intervalo de 0,6 a 1,0;
 50 cuyo anticuerpo está opcionalmente preparado mediante un proceso que comprende sustituir uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína.
8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se produce mediante el proceso de:
 60 (a) cultivar una célula que expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un dominio variable de cadena ligera, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 (b) aislar el anticuerpo de dicha célula cultivada.
9. Método de producción de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método comprende (a) cultivar una célula huésped seleccionada del grupo que comprende una célula eucariota y una célula CHO bajo condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y (b) aislar el
- 65

anticuerpo.

10. Inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, unido covalentemente a

- 5 (i) un agente citotóxico, opcionalmente un agente quimioterapéutico, un grupo farmacológico, un antibiótico, un isótopo radioactivo, y una enzima nucleolítica; o
- (ii) un marcador de captura, opcionalmente un marcador de captura de biotina;
- (iii) un marcador de detección, opcionalmente un marcador de detección de colorante fluorescente, tal como de tipo fluoresceína, de tipo rodamina, dansilo, Lissamine, una cianina, una ficoeritrina, Texas Red, y un análogo de los
- 10 mismos, o un marcador de detección de radionucleidos seleccionado entre ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At , y ^{213}Bi ; en el que el anticuerpo está opcionalmente unido al marcador de detección mediante un ligando quelante, opcionalmente DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA o TETA.

11. Inmunoconjugado según la reivindicación 10, en el que el inmunoconjugado tiene la fórmula $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$, en la que

- 15 (a) Ab es el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
- (b) L es un enlazador; y
- (c) D es un grupo farmacológico.

12. Inmunoconjugado, según la reivindicación 11, en el que

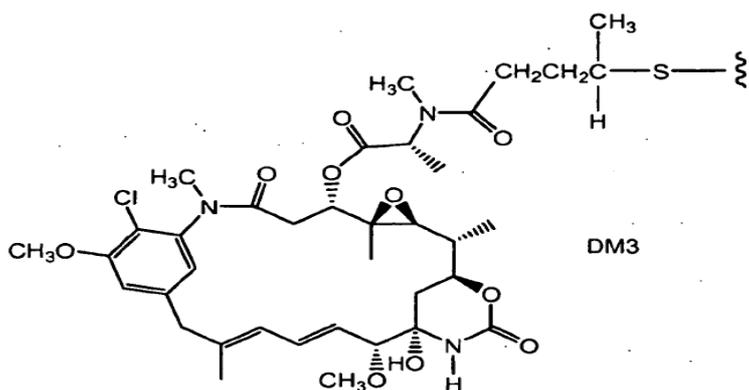
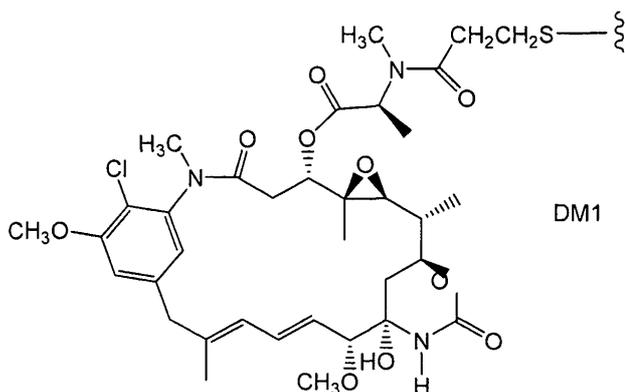
- 20 (i) L es opcionalmente 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxycarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio) pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano 1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), o (4-yodo-acetil) aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB); y/o el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF;
- (ii) el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo;
- 25 (iii) el enlazador es separable por una proteasa; o
- (iv) el enlazador comprende una unidad de p-aminobencilo.

13. Inmunoconjugado, según la reivindicación 11, teniendo el inmunoconjugado la fórmula $\text{Ab}-(\text{L}-\text{MMAE})_p$, en la que L es un enlazador y p varía de 2 a 5,

30 o teniendo la fórmula $\text{Ab}-(\text{L}-\text{MMAF})_p$, en la que L es un enlazador y p varía de 2 a 5.

14. Inmunoconjugado, según la reivindicación 13, en el que L comprende val-cit, MC o PAB, o en el que el inmunoconjugado tiene la fórmula $\text{Ab}-(\text{L}-\text{MMAF})_p$, en el que L comprende MC-PAB.

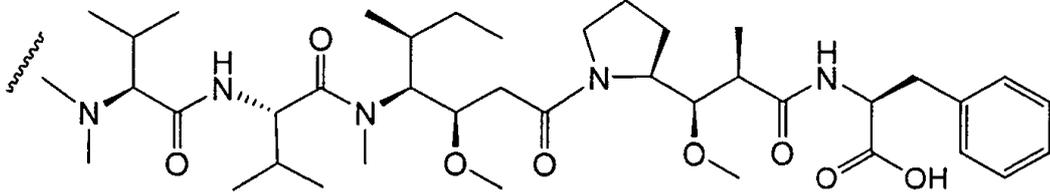
35 15. Inmunoconjugado, según la reivindicación 11, en el que D es un maitansinoide, opcionalmente seleccionado entre DM1, DM3 y DM4, en el que p es opcionalmente de 2 a 5 o de 3 a 4:



en la que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L;
 (vii) D es MMAF, que tiene la estructura:

5

10

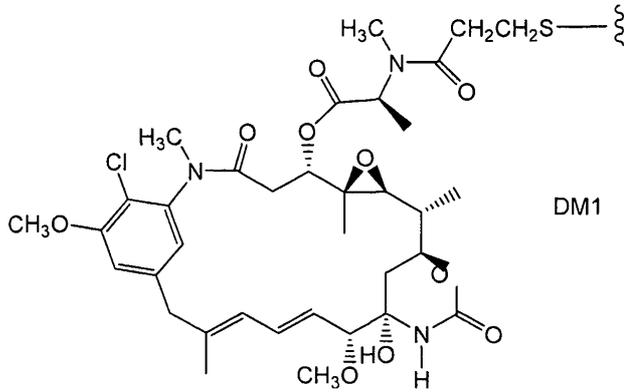


15

en la que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L;
 (viii) D es DM1 o DM4, que tienen las estructuras:

20

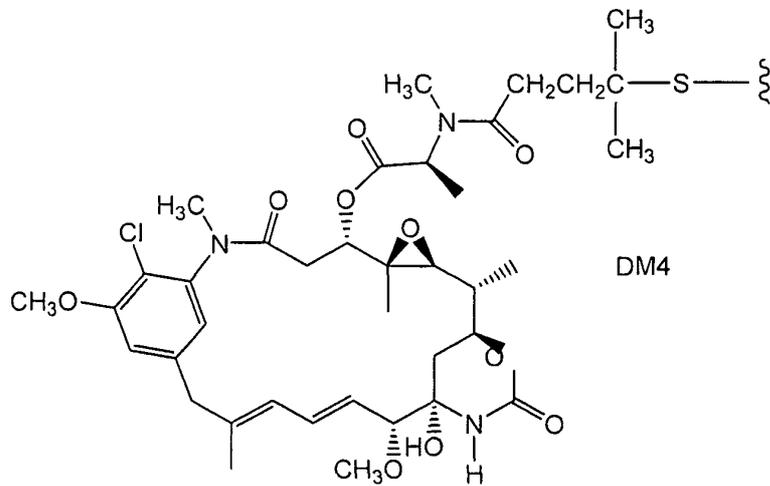
25



30

35

40



45

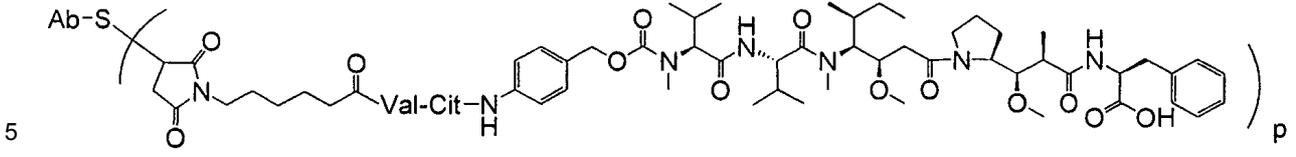
50

55

en las que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L;
 (ix) el compuesto inmunoconjugado se selecciona entre las estructuras:

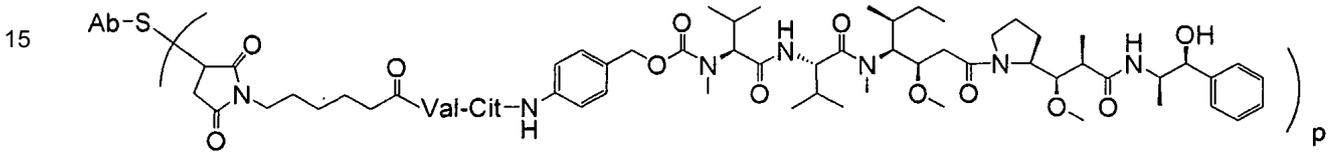
60

65



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

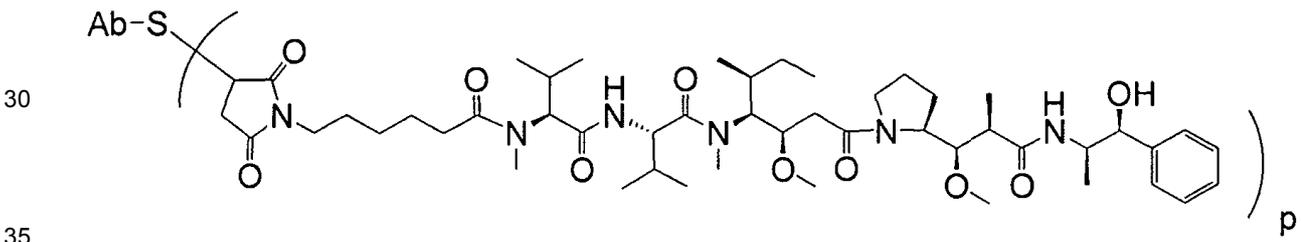
10



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

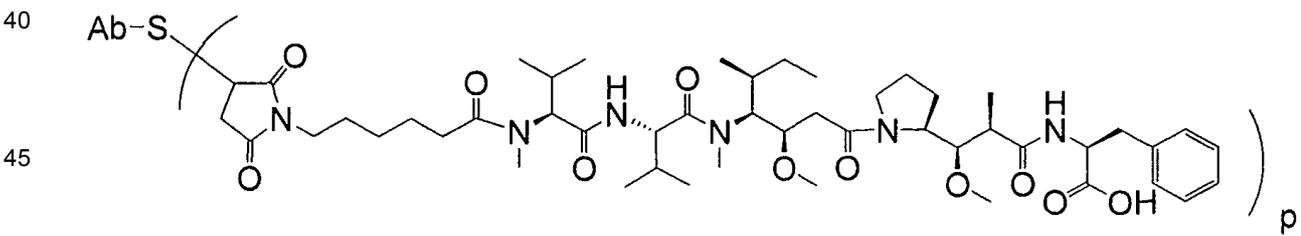
20

25



Ab-MC-MMAE

35



Ab-MC-MMAF

45

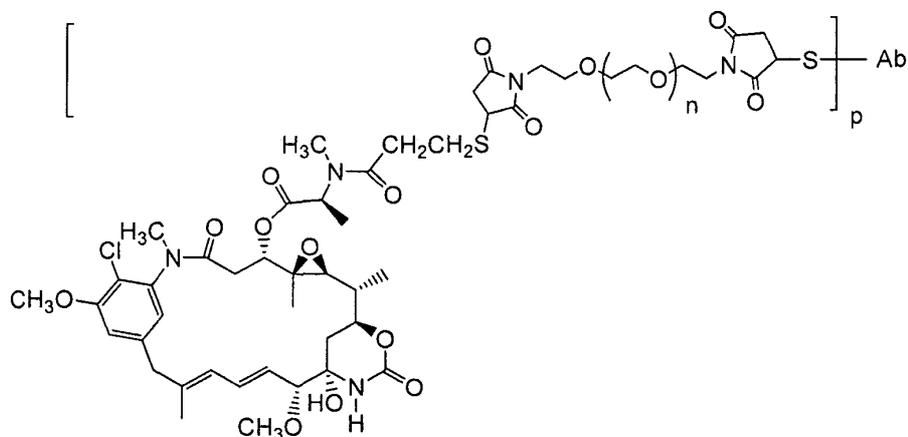
50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



Ab-BMPEO-DM1

en las que Val es valina y cit es citrulina;
(x) la auristatina es MMAE o MMAF, y/o
(xi) L es MC-val-cit-PAB o MC.

19. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, y un portador farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en combinación con un agente citotóxico.

20. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno proliferativo, opcionalmente en combinación con un agente citotóxico.

21. Anticuerpo según la reivindicación 20, para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho trastorno proliferativo es cáncer, opcionalmente linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

22. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, para utilizar en un método de tratamiento que comprende inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD79b, en el que dicha célula es una célula tumoral.

23. Método de determinación de la presencia de una proteína CD79b en una muestra sospechosa de contener dicha proteína, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, y determinar la unión de dicho anticuerpo o inmunoconjugado a dicha proteína CD79b en dicha muestra, en el que la unión del anticuerpo a dicha proteína es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra; en el que la muestra es opcionalmente de un paciente sospechoso de tener un trastorno proliferativo de células B, opcionalmente linfoma, linfoma no de Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de célula pilosa (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de célula de manto.

24. Método in vitro de inhibición del crecimiento de una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que dicha célula es opcionalmente una célula B y/o una célula tumoral.

25. Ensayo in vitro para detectar células B, que comprende:
(a) exponer células a un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el inmunoconjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18; y
(b) determinar el grado de unión del anticuerpo o compuesto inmunoconjugado a las células.

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCTTTCCCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIG. 1

DNA225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGETLRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Secuencia señal
Aminoácidos 1-28

Dominio transmembrana
Aminoácidos 5-25, 159-179

Dominio de inmunoglobulina
Aminoácidos 58-124

Motivo de activación de base tirosina de inmunoreceptor
Aminoácidos 193-213

Sitio de N-glicosilación
Aminoácidos 73-76, 101-104, 127-130, 128-131

Sitio de fosforilación de proteína quinasa C
Aminoácidos 49-51, 60-62, 156-158, 212-214

Sitio de fosforilación de caseína quinasa II
Aminoácidos 99-102, 156-159, 206-209, 221-224

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa
Aminoácidos 113-120

Sitio de N-miristoilación
Aminoácidos 40-45, 118-123

FIG. 2

CADENA LIGERA DE ANTI-CD79b HUMANA QUIMÉRICA (ch2F2)

GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTAT
TACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAGAGCGCCTAATTTATCTGGTGTCTAAACTGGATTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTGTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCCG
GAGGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGTTCTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIG. 3

CADENA LIGERA DE ANTI-CD79b HUMANA QUIMÉRICA (ch2F2)

DIVMTQTPLTSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGQSPERLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCCWQGTHTFPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 4

CADENA PESADA DE ANTI-CD79b HUMANA QUIMÉRICA (ch2F2)

**CAGGTTCAACTCCAGCAACCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATGATTGATCCTTCAGACAGTGAAACTCACTACAATCAT
ATCTTCAAGGACAAGGCCACTTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACTTGCAGCT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAATCTCTACTTGTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTTAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCCT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**

FIG. 5

CADENA PESADA DE ANTI-CD79b HUMANA QUIMÉRICA (ch2F2)

**QVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGLEWIGMIDPSDSETHYNH
IFKDKATLTVDKSSSTAYLQLSSLTSEDSAVYYCARNLYLWGQTSVTVSLASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVVFSCSVMHEALHNHYTO
KSLSLSPG**

FIG. 6

Secuencias VL

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

Kabat - CDR L1

Chothia - CDR L1

Contact - CDR L1

hukl	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q
mu2F2	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	T	L	S	V	T	I	G	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L
injerto hu2F2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	D	G	K	T	Y	L	N	W	Y	Q
hu2F2.D7	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	D	G	K	T	Y	L	N	W	Y	Q

Al 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 * *

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR L2

Chothia - CDR L2

Contact - CDR L2

hukl	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
mu2F2	Q	R	P	G	Q	S	P	E	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	P	D	R	F	T	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A
injerto hu2F2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
hu2F2.D7	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	

* B1 2 3 4 5 6 7 * * * * *

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3

Chothia - CDR L3

Contact - CDR L3

hukl	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 9
mu2F2	E	D	L	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 10
injerto hu2F2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	W	Q	G	T	H	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 11
hu2F2.D7	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	T	H	F	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	SEQ ID NO: 12

* C1 2 3 4 5 6 7 8 9 *

FIG. 7

Secuencias VH

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41
humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P		
mu2F2	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	Y	W	M	N	W	V	K	Q	R	P			
injerto hu2F2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	Y	W	M	N	W	V	R	Q	A	P			
hu2F2.D7	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	Y	W	M	N	W	V	R	Q	A	P			
	*																					*				D1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	*					*		

Kabat - CDR H1

Chothia - CDR H1

Contact - CDR H1

Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
---------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Kabat - CDR H2

Chothia - CDR H2

Contact - CDR H2

humIII	G	K	Q	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L		
mu2F2	G	Q	G	L	E	W	W	I	G	M	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	H	I	F	K	D	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	L		
injerto hu2F2	G	K	G	L	E	W	V	G	M	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	H	I	F	K	D	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L		
hu2F2.D7	G	K	G	L	E	W	V	G	M	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	H	I	F	K	D	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L		
	*							*					*											*			*		*		*		*		*		*		*		*		*
	E1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18																									

FIG. 8A

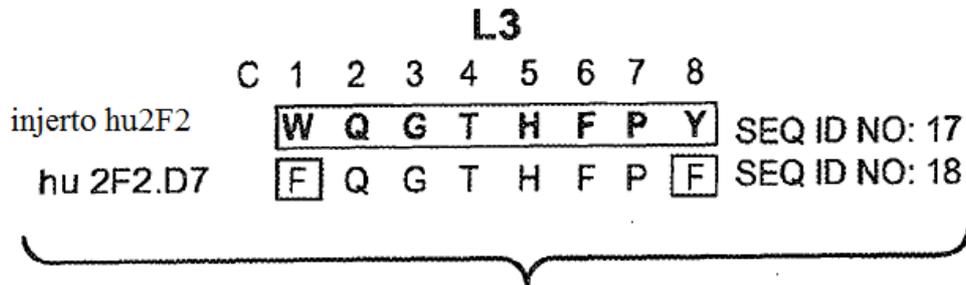


FIG. 9

Variante de 2F2	Biacore KD (nM)		Antígeno inmovilizado
	Fab	IgG	
ch 2F2	108	2.7	hu CD79b.ecd-Fc
	111	1.4	hu CD79b.ecd
		2	péptido de 15 unidades
injerto hu2F2	NB	NB	hu CD79b.ecd-Fc
		NB	hu CD79b.ecd
hu 2F2.D7	68	3.9	hu CD79b.ecd
		2.7	péptido de 16 unidades

FIG. 10

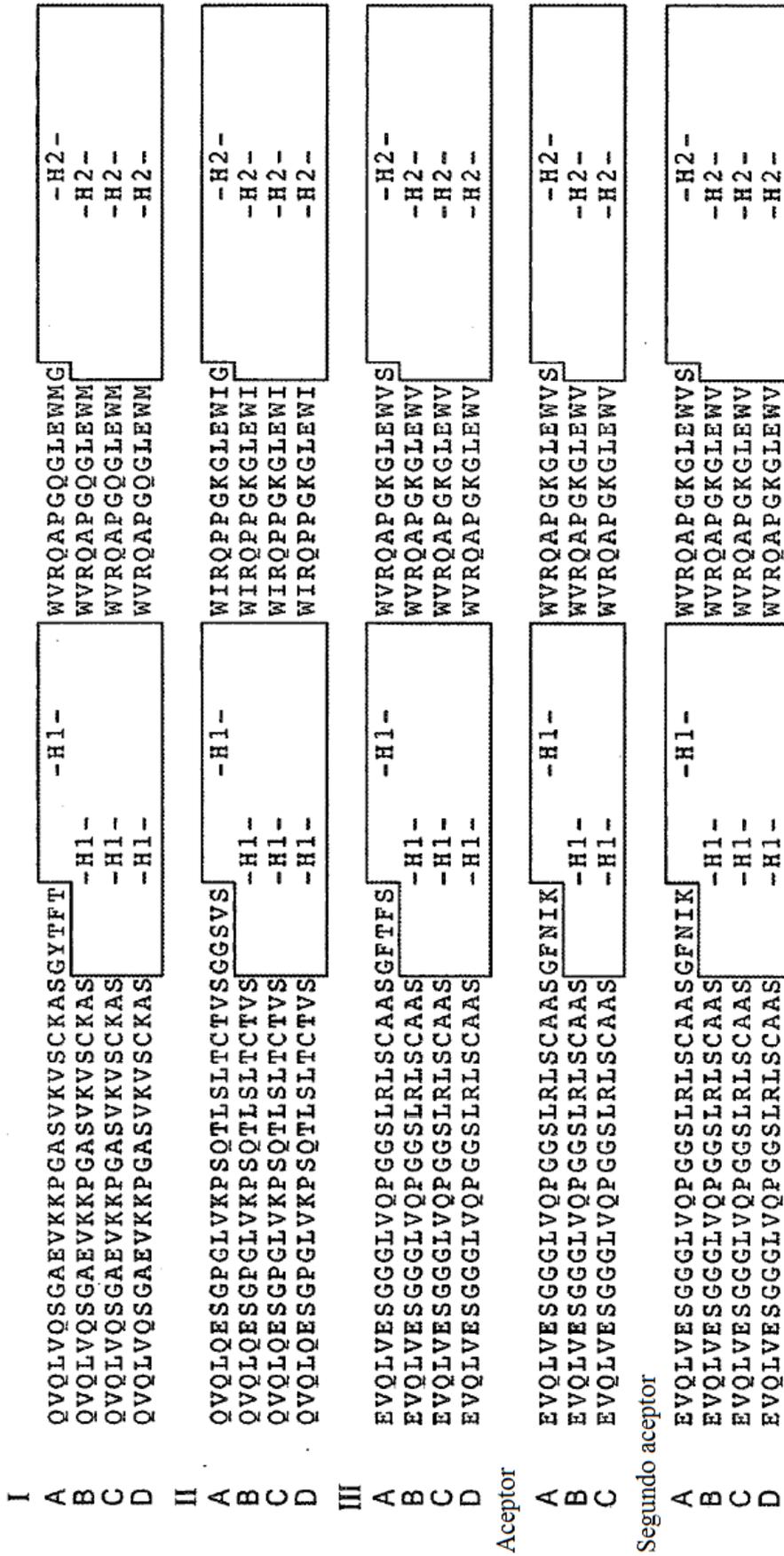


FIG. 11A

I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	AVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 36
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	AVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 37
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	AVYYCA		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 38
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	AVYYC		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 39
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 40
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 41
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCA		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 42
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYC		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 43
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 44
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 45
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 46
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 47
	Acceptor						
	A	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	SR	--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 48
	B	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	SR	--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 49
	C	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	SR	--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 50
	Segundo acceptor						
	A	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 51
	B	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 52
	C	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 53
	D	RFTISADTTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC		--H3--	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO.: 54

FIG. 11B

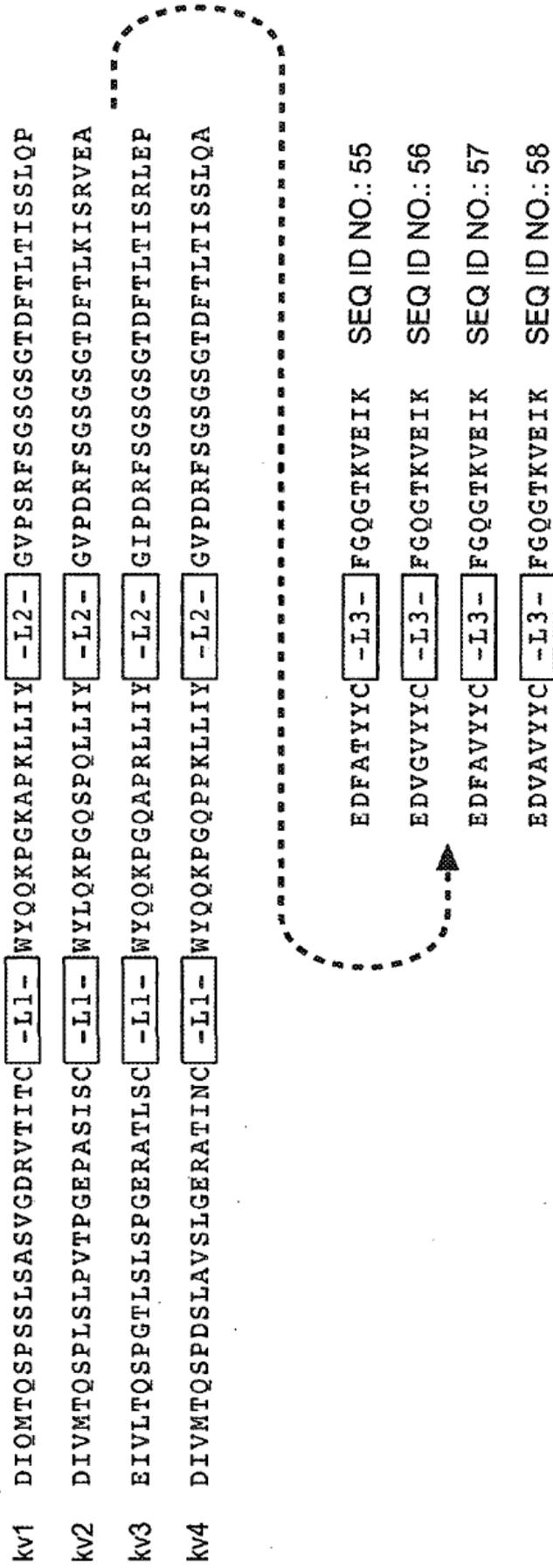


FIG. 12

A. Cadena ligera de hu2F2.D7

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC (SEQ ID NO: 19)
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 20)
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC (SEQ ID NO: 21)
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 22)
 HVR1-LC: KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 23)
 HVR2-LC: LVSKLDS (SEQ ID NO: 24)
 HVR3-LC: FQGFHFPFT (SEQ ID NO: 25)
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 26)

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQOKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCFQGFHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

Dominio variable de LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQOKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCFQGFHFPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 12)

B. Cadena pesada de hu2F2.D7

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLCAAS (SEQ ID NO: 27)
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 28)
 FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 29)
 FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 30)
 HVR1-HC: GYTFTSYWMN (SEQ ID NO: 31)
 HVR2-HC: GMIDPSDSETHYNHIFKD (SEQ ID NO: 32)
 HVR3-HC: ARNLYL (SEQ ID NO: 33)
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT
 (SEQ ID NO: 34)
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 35)

Cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 90)

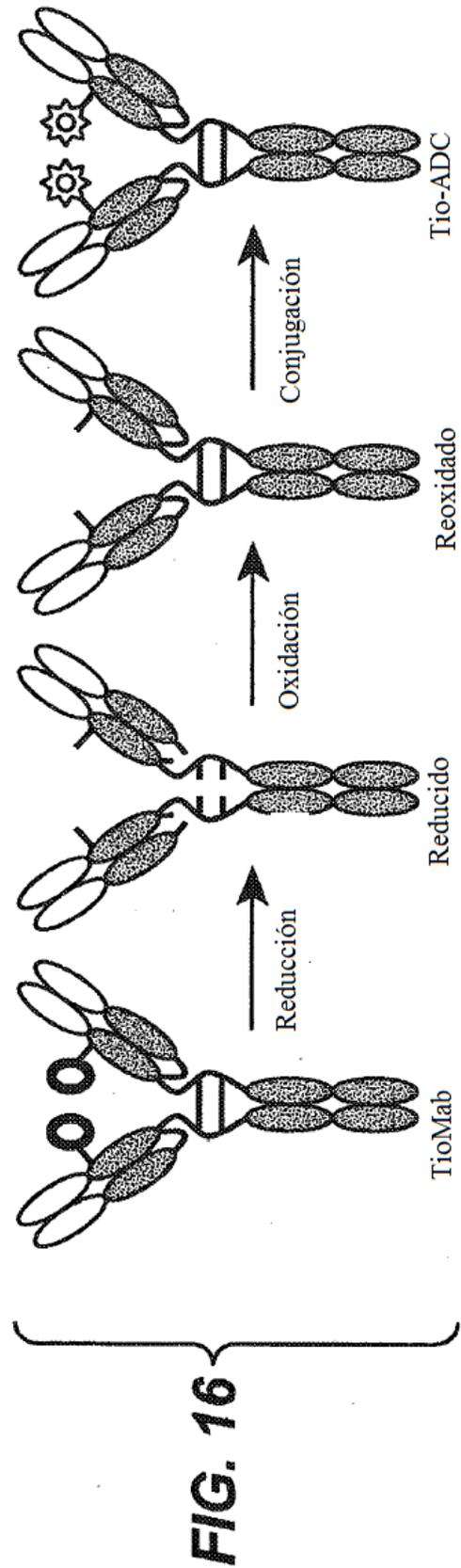
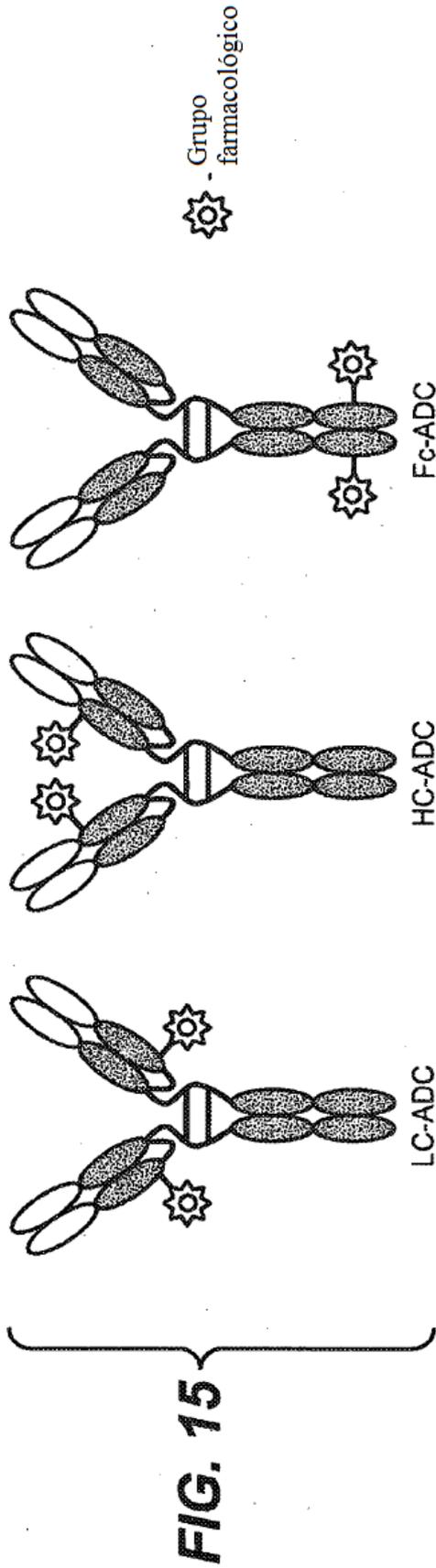
Dominio variable de HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
 DRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16)

FIG. 13

	Secuencia señal	Péptido de prueba	
hCD79b	1	MARLALSPVPSHWMVALLLLSAEP-VPAARSEDRYRNPKG	SACSRIWQS 49
CynCD79b	1	MARLALSPVSSHVLVALLLLSAEPVPAARKSEDLYPNPKG	SACSRIWQS 50
mCD79b	1	MATLVLSSMPCHWLLFLLLFSGEP-VPAMTSSDLLNFQGS	PCSQIWQH 49
hCD79b	50	PRFIARKRGFTVKMHCYMN-SASGNVSWLWKQEMDENPQQL	KLEKGRMEE 98
CynCD79b	51	PRFIARKRGFTVKMHCYVINS:TF:SI:VSWLRKRETDKEP	Q:VNL:EQ:GH:MH:Q 100
mCD79b	50	PRFAAKR:SSMVKFHCY:TN:--HS:GAL:TWFRKRGSQ:Q:PEL:VS:EGRI:VQ:	96
hCD79b	99	SQNEISL:ATLTIQ:GIRFEDNGIYFCQQKCN-NTSEVYQGC	TELRVMGFST 147
CynCD79b	101	TQNSSV:TTLIIQ:DIRFEDNGIYFCQQE:CS-KTSEVYR	GCGTELRVMGFST 149
mCD79b	97	TQNGSVY:TLTIQNIQYEDNGIYFCQKQK:DSANHNVTDS	C:GTELLV:LG:FS:ST 146
hCD79b	148	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIIVPIFLLLDKDD	SKAGMEE:DH:TYE 197
CynCD79b	150	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIIVPIFLLLDKDD	SKAGMEE:AD:DH:TYE 199
mCD79b	147	L:DL:QLK:R:R:R:NTL:K:DG:I:IL:IQ:TL:LI:IL:FI:IV:PI:FL:LL:DK:DD:G:K:AG:ME:ED:DH:TYE:	196
hCD79b	198	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPPGQE	229 SEQ ID NO: 2
CynCD79b	200	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPPGQE	231 SEQ ID NO: 7
mCD79b	197	GLN:IDQ:TATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPPGQE	228 SEQ ID NO: 8

FIG. 14



TioMAB de cadena pesada modificada con cisteínas A118C hu2F2.D7 anti-CD79b

A. Secuencia de cadena ligera
Tio-hu2F2.D7-HC-A118C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGTHTFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)

B. Secuencia de cadena pesada
Tio-hu2F2.D7-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 85)

FIG. 17

TioMAB de cadena ligera modificada con cisteínas V205C hu2F2.D7 anti-CD79b

A. Secuencia de cadena ligera
Tio-hu2F2.D7-LC-V205C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGTHTFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 88)

B. Secuencia de cadena pesada
Tio-hu2F2.D7-LC-V205C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 87)

FIG. 18

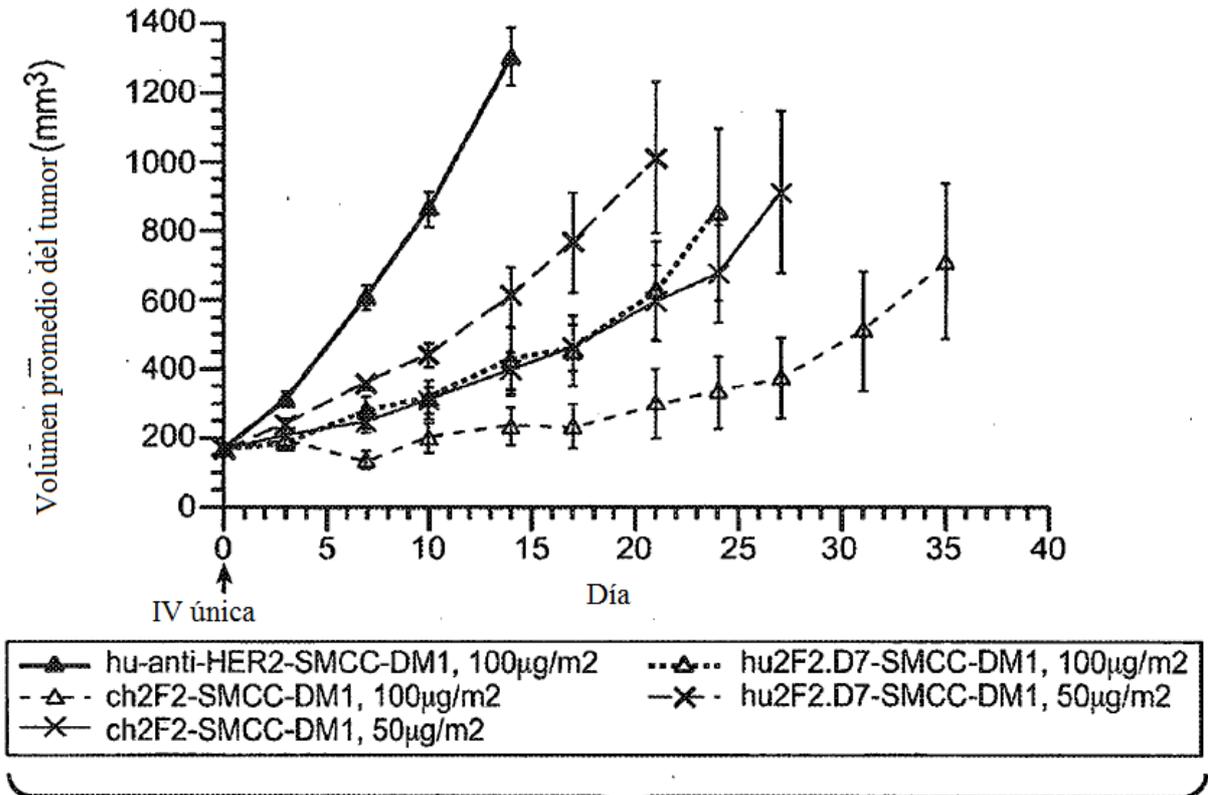


FIG. 19

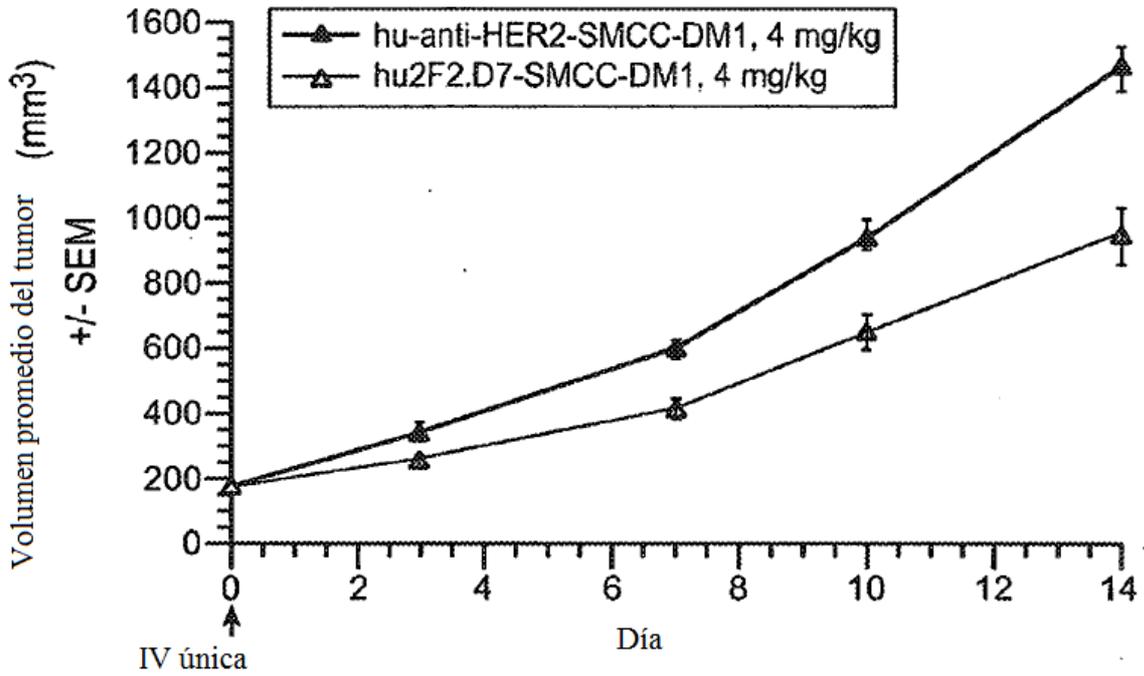


FIG. 20A

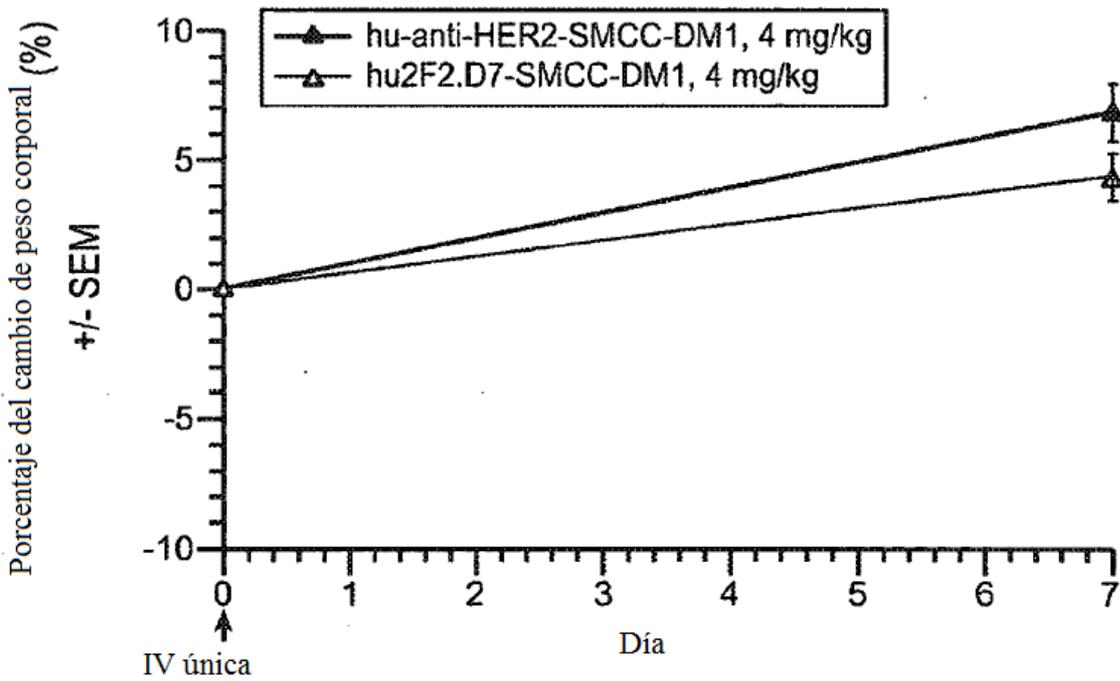


FIG. 20B