

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 572**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/US2013/049519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13737118 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2869847**

54 Título: **Inmunocombinados que comprenden anticuerpos anti-CD79b**

30 Prioridad:

09.07.2012 US 201261669268 P
15.11.2012 US 201261726742 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

POLAKIS, PAUL;
POLSON, ANDREW;
SPENCER, SUSAN DIANE;
YU, SHANG-FAN y
ZHENG, BING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 572 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

Inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-CD79b

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-CD79b y a métodos para usar los mismos.

10 Antecedentes

El CD79 es el componente de señalización del receptor de linfocitos B que consiste en un heterodímero covalente que contiene CD79a (Ig α , mb-1) y CD79b (Ig β , B29). El CD79a y el 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 basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM). El CD79 se expresa en los linfocitos B y, por ejemplo, en células de linfoma no hodgkiniano (NHL, por sus siglas en inglés) (Cabezudo et al., Haematologica, 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 se requieren todos para la expresión en superficie del CD79 (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7)). La expresión en superficie promedio del CD79b en las NHL es similar a aquel de los linfocitos B normales, pero con un intervalo mayor (Matsuuchi et al., Curr. Opin. Immunol., 13(3): 270-7 (2001)).

Hay una necesidad en la técnica de agentes que marquen como diana el CD79b para el diagnóstico y el tratamiento de afecciones asociadas a CD79b, tales como cáncer. La invención suple esa necesidad y proporciona otros beneficios.

Sumario

La invención proporciona anticuerpos anti-CD97b e inmunoconjugados y métodos para usar los mismos. La materia objeto que no está abarcada bajo el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención presentemente reivindicada.

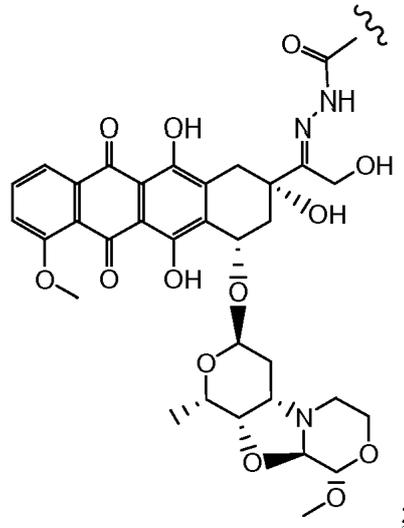
Se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b fijado covalentemente a un agente citotóxico, de acuerdo con las reivindicaciones. El agente citotóxico es un derivado de nemorubicina de acuerdo con las reivindicaciones. El anticuerpo que se une a CD79b comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24, y 35, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: a) una secuencia VH que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11; o b) una secuencia VL que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12; o c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 11 y 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8, 10, 12 y 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.

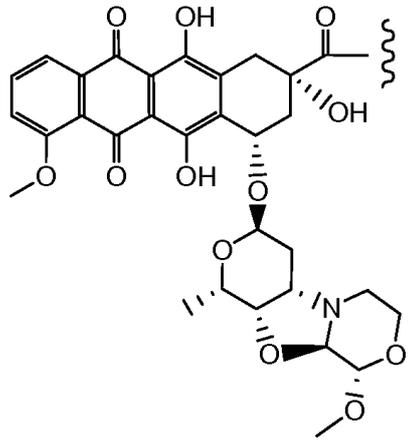
En algunas realizaciones, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b fijado covalentemente a un agente citotóxico, de acuerdo con las reivindicaciones, en el que el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una secuencia VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el agente citotóxico es un derivado de nemorubicina, de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene la fórmula AB-(L-D)_p, en la que: (a) Ab es el anticuerpo; (b) L es un conector; (c) D es el agente citotóxico; y (d) p varía de 1-8, de acuerdo con las reivindicaciones.

D tiene una estructura seleccionada de:



y

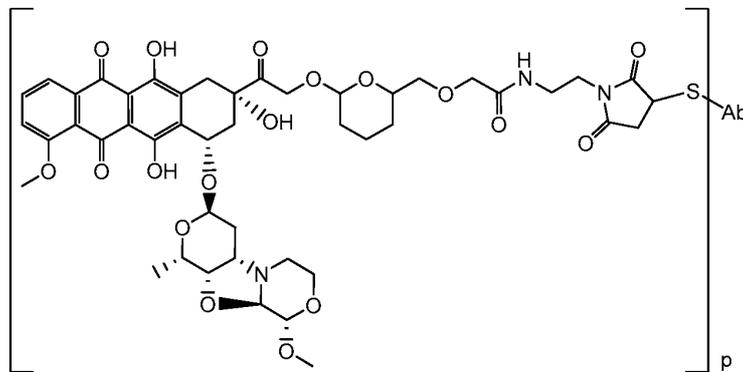


5

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un conector que es escindible por una proteasa. En algunas de dichas realizaciones, el conector comprende un dipéptido val-cit o un dipéptido Phe-homoLys. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un conector que es lábil al ácido. En algunas de dichas realizaciones, el conector comprende hidrazona.

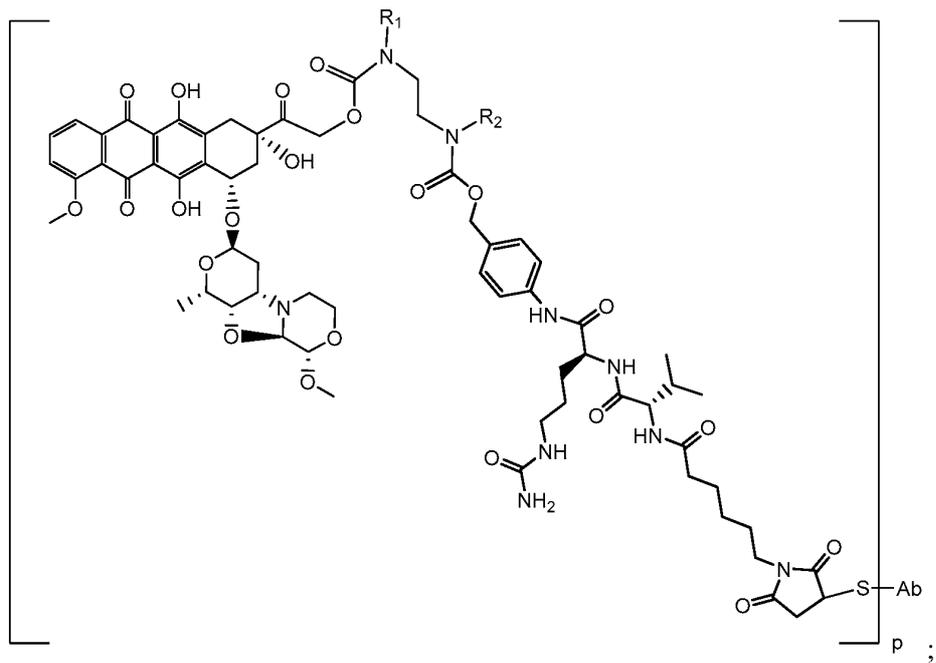
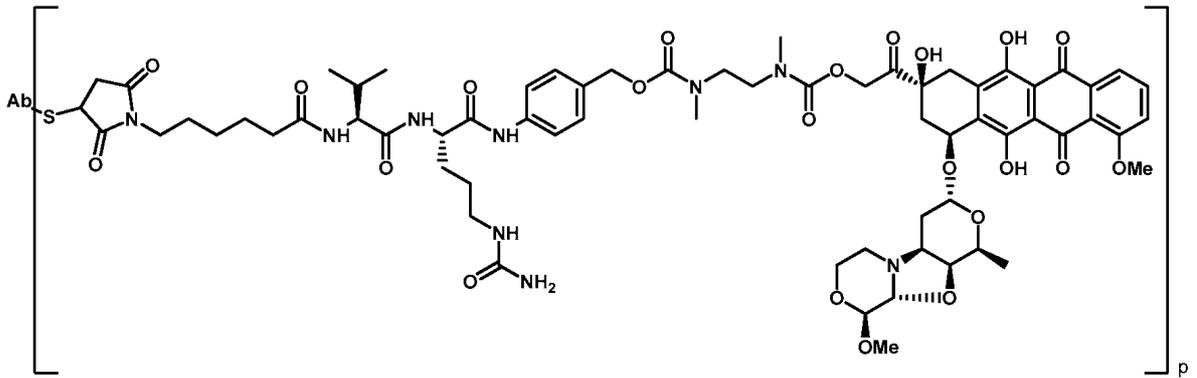
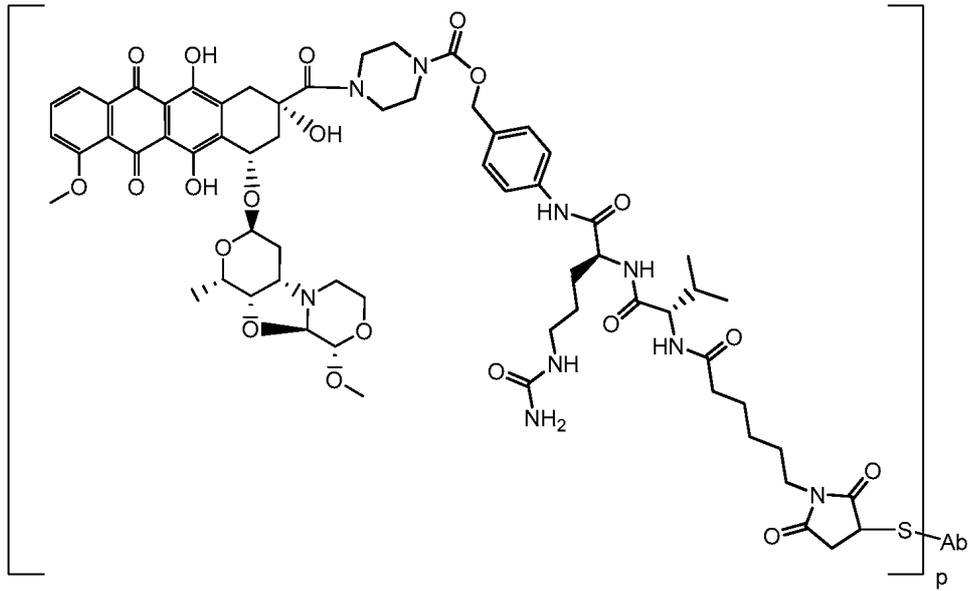
10

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado tiene una fórmula seleccionada de:

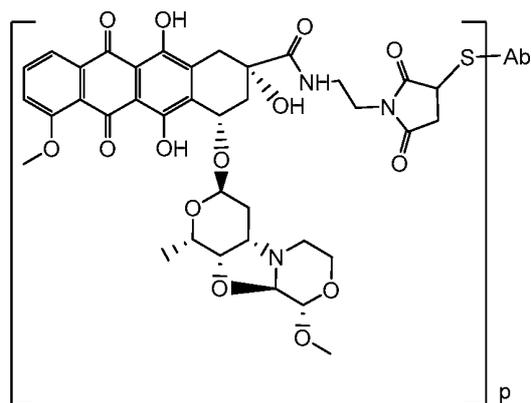


;

15



5
y

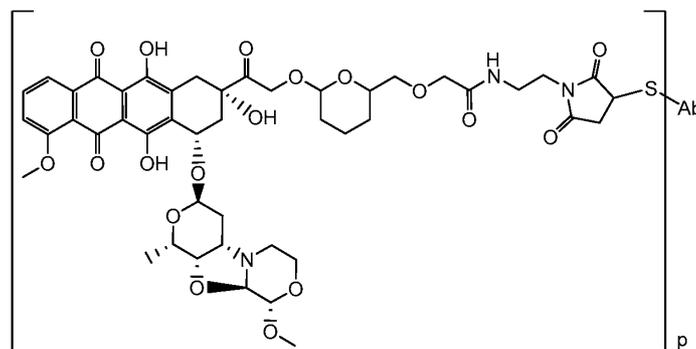


;

en las que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de H y alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, p varía de 1-3.

5

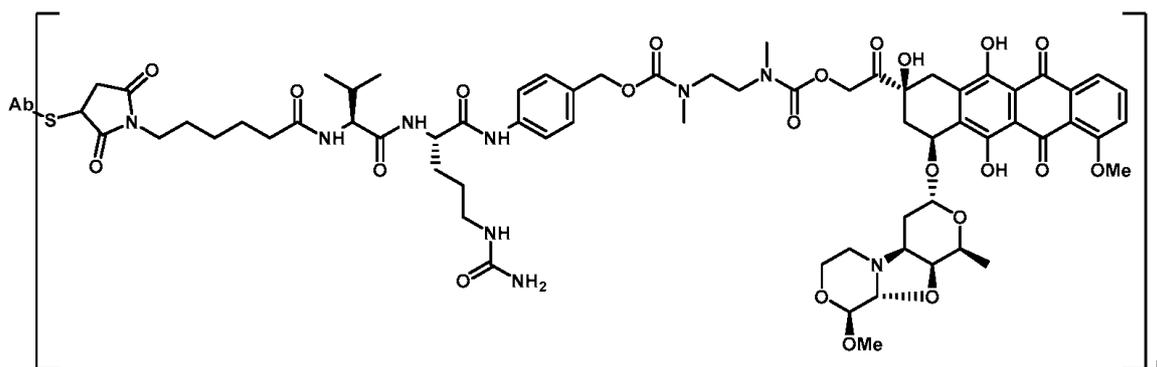
En algunas realizaciones, se proporciona un inmunoconjugado, en el que el inmunoconjugado tiene una fórmula seleccionada de:



;

10

y



;

15 en la que Ab es un anticuerpo que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y en la que p varía de 1 a 3. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 11 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

20

En cualquiera de las realizaciones analizadas en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo

monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a CD79b. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD79b. En algunas de dichas realizaciones, el CD79b humano tiene la secuencia de SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 41.

5 En algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas, en las que la formulación comprende un inmunocombinado descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente terapéutico adicional.

10 Se desvelan métodos para tratar a un individuo con un cáncer positivo a CD79b. El método puede comprender administrar al individuo una cantidad eficaz del inmunocombinado descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivado, NHL recidivado indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional al individuo. En algunas de dichas realizaciones, el agente terapéutico adicional comprende un anticuerpo que se une a CD22. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inmunocombinado que comprende un anticuerpo que une CD22 covalentemente unido a un agente citotóxico.

20 Se desvela un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b, en el que el cáncer positivo a CD79b es resistente a un primer agente terapéutico. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un inmunocombinado descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivado, NHL recidivado indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico es un primer inmunocombinado que comprende un primer anticuerpo que se une a un antígeno distinto del CD79b y un primer agente citotóxico. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une a CD22. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico comprende un primer anticuerpo que se une a CD79b. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico es un primer inmunocombinado que comprende un primer anticuerpo que se une a CD79b y un primer agente citotóxico. En algunas realizaciones, el primer agente citotóxico y el agente citotóxico del inmunocombinado descrito en el presente documento son diferentes. En algunas realizaciones, el primer agente citotóxico es un agente citotóxico MMAE. En algunas realizaciones, el primer agente citotóxico es un pirrolobenzodiazepina. En algunas realizaciones, el primer agente citotóxico es un maitansinoide. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b que es resistente a un primer agente terapéutico expresa la glucoproteína P (P-gp).

Se desvela un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b, en el que el cáncer positivo a CD79b expresa P-gp. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un inmunocombinado descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b / P-gp positivo se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivado, NHL recidivado indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b / P-gp positivo expresa mayores niveles de ARNm y/o de proteína de P-gp que las células o el tejido control.

45 Se desvela un método para inhibir la proliferación de una célula CD79b positiva. En algunas de dichas realizaciones, el método comprende exponer la célula al inmunocombinado descrito en el presente documento en condiciones que permitan la unión del inmunocombinado a CD79b sobre la superficie de la célula, inhibiendo de esta manera la proliferación sobre la célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula B neoplásica. En algunas realizaciones, la célula es una célula de linfoma.

Breve descripción de las figuras

55 Las **Figuras 1A-1B** muestran la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo Ma79b anti-CD79b murino alineada con el injerto MA79b humanizado y las versiones humanizadas 17, 18, 28 y 32 (injerto huMA79b, huMA79bv17, huMA79bv18, huMA79bv28 y huMA79bv32, respectivamente) y alineada a la secuencia del subgrupo III humano. Las HVR están en cajas (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3). Las secuencias que dejan entre corchetes las HVR son las secuencias marco (FR-H1 a FR-H4). Las secuencias se numeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican sobre las HVR en cajas.

60 Las **Figuras 2A-2B** muestran la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo Ma79b anti-CD79b murino alineada con el injerto MA79b humanizado y las versiones humanizadas 17, 18, 28 y 32 (injerto huMA79b, huMA79bv17, huMA79bv18, huMA79bv28 y huMA79bv32, respectivamente) y alineada a la secuencia kappa I del subgrupo humano. Las HVR están en cajas. Las secuencias FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 dejan entre corchetes las HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Las secuencias se numeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican sobre las HVR en cajas.

La **Figura 3** muestra las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variables y constantes) de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo huMA79bv28 anti-CD79b humanizado, isotipo IgG1. Las porciones subrayadas son los dominios constantes.

La **Figura 4** muestra las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos diseñados con cisteína anti-CD79b en los que la cadena ligera o la cadena pesada o la región Fc se alteran para reemplazar un aminoácido con una cisteína en posiciones de aminoácidos seleccionadas. Los anticuerpos diseñados con cisteína mostrados incluyen la cadena pesada Thio-huMA79bv28-HC-A118C, en la que la alanina en la posición EU 118 (posición secuencial alanina 118) se altera a una cisteína; cadena ligera Thio-huMA79b.v28-LC-V205C en la que una valina en la posición Kabat 205 (posición secuencial valina 209) se altera a una cisteína; y cadena pesada Thio-huMA79b.v28-HC-S400C en la que una serina en la posición EU 400 (posición secuencial serina 400) se altera a una cisteína. En cada figura, el aminoácido alterado se muestra en texto en negrita con doble subrayado. El subrayado sencillo indica regiones constantes. Las regiones variables no están subrayadas.

La **Figura 5** muestra el conector y las estructuras de fármaco de (A) huMA79bv28-PNU-2; y (B) huMA79bv28-PNU-1, que se describen en el Ejemplo A.

La **Figura 6** muestra la efectividad de diversos conjugados anticuerpo-fármaco en un modelo de xenoinjerto de ratón WSU-DLCL2, como se describe en el Ejemplo B.

La **Figura 7** muestra la efectividad de diversos conjugados anticuerpo-fármaco en un modelo de xenoinjerto de ratón Granta-519, como se describe en el Ejemplo C.

La **Figura 8** muestra la efectividad de diversos conjugados anticuerpo-fármaco en un modelo de xenoinjerto de ratón SuDHL4-luc, como se describe en el Ejemplo D.

La **Figura 9** muestra la inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral por huMA79bv28-PBD en un modelo de xenoinjerto de ratón SuDHL4-luc, como se describe en el Ejemplo E.

La **Figura 10** muestra la inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral por huMA79bv28-PBD en un modelo de xenoinjerto de ratón BJAB-luc, como se describe en el Ejemplo F.

La **Figura 11** muestra la inhibición del crecimiento tumoral por huMA79bv28-MMAE en un modelo de xenoinjerto de ratón BJAB-luc, como se describe en el Ejemplo G.

La **Figura 12** muestra la expresión de P-gp en células resistentes BJAB.Luc_ SN8v28-vcE(CD79b)_T1.1X1 y BJAB.Luc_ SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1 y en células Bjab-luc que expresan de forma estable P-gp como se determina por FACS, como se describe en el Ejemplo H.

La **Figura 13** muestra la inhibición dependiente de dosis de las células Bjab-luc que expresan de forma estable P-gp por PNU-159682, como se describe en el Ejemplo H.

Descripción detallada

I. DEFINICIONES

Un "marco aceptor humano" para los fines del presente documento es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco humano aceptor VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o la secuencia marco consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos anteriormente. Las realizaciones ilustrativas y a modo de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

Un anticuerpo con "afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee tales alteraciones, dando como resultado tales alteraciones en una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Las frases "anticuerpo anti-CD79b" y "un anticuerpo que se une a CD70b" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a CD79b con suficiente afinidad tal que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico al marcar como diana CD79b. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD79b a una proteína distinta de CD79b no relacionada es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a CD79b como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a CD79b tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 3 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M ,

por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD79b se une a un epítipo de CD79b que está conservado entre el CD79b de diferentes especies.

5 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo de tal manera que exhiban la actividad antígeno-anticuerpo deseada.

10 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto y que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

15 Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más e inversamente, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competición a modo de ejemplo.

20 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento/la proliferación celular no regulada. Los ejemplos de cáncer incluyen, melanoma, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano), blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de cáncer incluyen cánceres asociados a linfocitos B, incluyendo, por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de linfocitos B tales como, por ejemplo, linfoma de linfocitos B de tejido linfoide asociado a la mucosa y linfoma no hodgkiniano (NHL), linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica (CLL), tales como leucemia de linfocitos B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tales como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL) y mielodisplasia) y otros cánceres hematológicos y/o asociados a linfocitos B o a linfocitos T. También se incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y linfocitos citolíticos naturales. También se incluyen trastornos proliferativos de linfocitos B cancerosos seleccionados de los siguientes: linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivado, NHL recidivado indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. Los orígenes de cánceres de linfocitos B incluyen como sigue: el linfoma de linfocitos B de zona marginal se origina en los linfocitos B de memoria en la zona marginal, el linfoma folicular y el linfoma de linfocitos B grandes difusos se origina en los centrocitos en la zona de la luz de los centros germinales, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfocítica pequeña se originan en los linfocitos B1 (CD5+), el linfoma de las células del manto se origina en los linfocitos B inmaduros en la zona del manto y el linfoma de Burkitt se origina en los centroblastos en la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas denominados en el presente documento "tejidos de células hematopoyéticas" incluyen el timo y la médula ósea y los tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo, los nodos linfáticos, los tejidos linfoides asociados a la mucosa, tales como los tejidos linfoides asociados al intestino, las amígdalas, los parches de Peyer y el apéndice y los tejidos linfoides asociados a otras mucosas, por ejemplo, los revestimientos bronquiales. Los ejemplos particulares adicionales de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células microcíticas, Cáncer de pulmón de células no microcíticas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello de útero, 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 las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

55 Una "malignidad de linfocitos b" en el presente documento incluye linfoma no hodgkiniano (NHL), incluyendo NHL de bajo grado/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA y Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no hodgkiniano (NHL), enfermedad de Hodgkin predominante de linfocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), NHL indolente incluyendo NHL indolente recidivado y NHL indolente refractario por rituximab; leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica; linfoma de Burkitt; linfoma de células del manto; y otras malignidades hematológicas. Tales malignidades pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra marcadores de la superficie de los linfocitos B, tales como CD79b. Tales enfermedades se contemplan en el presente documento a tratarse mediante la administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de los linfocitos B, tal como CD79b e incluye la administración de un anticuerpo sin

conjugar ("desnudo") o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como se desvela en el presente documento. Tales enfermedades también se contemplan en el presente documento a tratarse por terapia de combinación que incluye un anticuerpo anti-CD79b o un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-CD79b de la invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado fármaco anticuerpo, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie. En un método de tratamiento a modo de ejemplo, se administra un inmunoconjugado anti-CD79b en combinación con un anticuerpo anti-CD22, una inmunoglobulina o un fragmento de unión a CD22 de la misma, bien juntos o secuencialmente. El anticuerpo anti-CD22 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de fármaco anticuerpo. En otro método de tratamiento a modo de ejemplo, se administra un inmunoconjugado anti-CD79b en combinación con un anticuerpo anti-CD20, una inmunoglobulina o un fragmento de unión a CD20 de la misma, bien juntos o secuencialmente. El anticuerpo anti-CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de fármaco anticuerpo. En algunas realizaciones de la terapia de combinación, el inmunoconjugado anti-CD79b se administra con Rituxan® (rituximab).

La frase "linfoma no hodgkiniano" o "NHL", como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer del sistema linfático distinto de los linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin pueden distinguirse generalmente de los linfomas no hodgkinianos por la presencia de células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y la ausencia de dichas células en los linfomas no hodgkinianos. Los ejemplos de los linfomas no hodgkinianos abarcados por el término como se usa en el presente documento incluyen cualquiera que se identificaría como tal por un experto en la materia (por ejemplo, un oncólogo o un patólogo) de acuerdo con los esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tales como el esquema Revised European-American Lymphoma (REAL) como se describe en Color Atlas of Clinical Hematology (3a edición), 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. Los ejemplos más específicos incluyen, NHL recaído o refractario, NHL de línea frontal o bajo grado, NHL de fase III/IV, NHL resistente a quimioterapia, leucemia linfoblástica de precursores B y/o linfoma, linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfocítica crónica de linfocitos b y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos b, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos b de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de la zona marginal extranodal - MALT, linfoma de la zona marginal nodal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de grado bajo/folicular, NHL de grado intermedio/folicular, linfoma de células del manto, linfoma del centro del folículo (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma de linfocitos b grandes difusos, NHL agresivo (incluyendo NHL de línea frontal agresivo y NHL recaído agresivo), NHL recaído después de o refractario a trasplante de células madre autólogas, linfoma de linfocitos b grandes mediastinal primario, linfoma de efusión primario, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma de Burkitt, leucemia de precursor linfocítico granular grande (periférico), micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfomas de piel (cutáneos), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angiocéntrico.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseídos por su cadena pesada. Hay cinco clases mayores de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La frase "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o que causa la muerte o la destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos; y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados a continuación.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etilniminas y metilamelaminas incluyendo alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; atetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas

(particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 11 y calicheamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostana, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; Vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] libre de Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN[®]); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA[®]); sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; CVP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN[™]) combinado con 5-FU y leucovorina.

"Funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a Clq y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos b); y activación de linfocitos b.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "epítipo" se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo.

La frase "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La frase incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede o puede no estar presente. Salvo que se especifique de otra manera en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o la región constante es de acuerdo al sistema de numeración EU, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Marco" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las frases "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo entero" se usan en el presente

documento intercambiamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

- 5 La frase "formas glucosiladas de CD79b" se refiere a formas de origen natural de CD79b que se modifican post-traduccionalmente por la adición de restos de carbohidratos.

10 Las frases "célula hospedadora", "línea de células hospedadoras" y "cultivo de células hospedadoras se usan intercambiamente y se refieren a células en las que se han introducido ácidos nucleicos exógenos, incluyendo la progenie de tales células. Las células hospedadoras incluyen "células transformantes" y "transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin tener en cuenta el número de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica a una célula parental en el contenido de ácido nucleico, sino que puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la buscada o seleccionada en la célula originalmente transformada se incluye en el presente documento.

15 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígenos no humanos.

20 Un "marco consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos de aparición más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de las secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

30 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanos y restos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas de las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano y todos o sustancialmente todos de los FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

40 La frase "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Por lo general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativas comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Los HVR comprenden generalmente restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), siendo las últimas de la mayor variabilidad de secuencia y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos. Los bucles hipervariables a modo de ejemplo se dan en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987).) Las CDR a modo de ejemplo (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se dan en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de especificidad" o "SDR", que son restos que contactan el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR denominadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se dan en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008).) A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos de FR= se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

60 Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más molécula o moléculas heterólogas, incluyendo un agente citotóxico.

65 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un humano.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha separado de un componente de su ambiente natural. En algunas

realizaciones, un anticuerpo se purifica a más del 95 % o el 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

5 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en las células que de forma ordinaria contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

10 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b" se refiere a una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos (o fragmentos de los mismos), incluyendo tales molécula o moléculas de ácidos nucleicos en un vector único o en vectores separados y tales molécula o moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más localizaciones en una célula hospedadora.

15 El término "CD79b", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier CD79b nativo de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo humanos, el mono cinomolgus (cyno) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), salvo que se indique de otra manera. El término abarca CD79b "de longitud completa" sin procesar así como cualquier forma de CD79b que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de CD79b, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas e isoformas. La secuencia de aminoácidos de un precursor CD79b humano a modo de ejemplo (con secuencia señal) se muestra en SEQ ID NO: 40. La secuencia de aminoácidos de un CD79b maduro humano a modo de ejemplo (sin secuencia señal) se muestra en SEQ ID NO: 41.

20 La frase "cáncer positivo a CD79b" se refiere a un cáncer que comprende células que expresan CD79b en su superficie.

25 La frase "célula CD79b positiva" se refiere a una célula que expresa CD79b en su superficie.

30 La frase "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto las posibles variantes de anticuerpo, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, estando presentes tales variantes generalmente en cantidades menores. Al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo estando obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no ha de tomarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por diversas técnicas, incluyendo pero no limitado al método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de visualización de fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todo o parte de los loci de inmunoglobulinas humanas, describiéndose tales métodos y otros métodos a modo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales en el presente documento.

35 Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o una radiomarca. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

40 "Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina con estructuras variadas. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen por disulfuro. Del N al C terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similarmente, del N al C terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada un dominio ligero variable o un dominio ligero de la cadena pesada, seguido de un dominio de cadena constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (k) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

45 El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la terapia de combinación, las contraindicaciones y/o los avisos que se refieren al uso de tales productos terapéuticos.

60 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a

los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software de ordenador públicamente disponible tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o software Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 es de Genentech, Inc. y el código fuente se ha llenado con documentación de usuario de la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el N.º de Registro de U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., San Francisco sur, California, o puede compilarse desde el código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema de funcionamiento UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede frasearse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

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

donde X es el número de restos de aminoácidos clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos de B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad secuencia de aminoácidos de B a A. Salvo que se diga específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa de ordenador ALIGN-2.

La frase "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permita la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma para ser eficaz y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramáticas del mismo tal como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el transcurso natural del individuo a tratarse y puede realizarse bien para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, evitar la aparición o la reaparición de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia directa o indirecta patológica de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la velocidad del avance de la enfermedad, aliviar o paliar el estado de la enfermedad y remitir o mejorar la prognosis. En algunas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar el avance de una enfermedad.

La frase "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que unen un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que une el antígeno para detectar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se conecta. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico auto-replicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

“Alquilo” es hidrocarburo C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos son metilo (-CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-

- 5 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).

- El término “alquilo C₁-C₈” como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos “alquilo C₁-C₈” representativos incluyen, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, los alquilos C₁-C₈ insaturados incluyen, pero no se limitan a, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetinilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo. Un grupo alquilo C₁-C₈ puede no estar sustituido o sustituido con uno o más grupos incluyendo, -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', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

- 25 El término “alquilo C₁-C₆” como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos “alquilo C₁-C₆” representativos incluyen, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo y -n-hexilo; mientras que los alquilos C₁-C₆ ramificados incluyen, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y 2-metilbutilo; los alquilos C₁-C₆ insaturados incluyen, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo e -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo y 3-hexilo. Un grupo alquilo C₁-C₆ puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos, como se describe anteriormente para el grupo alquilo C₁-C₈.

- El término “alquilo C₁-C₄” como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos “alquilo C₁-C₄” representativos incluyen, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo; mientras que los alquilos C₁-C₄ ramificados incluyen, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo; los alquilos C₁-C₄ insaturados incluyen, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo e -isobutilenilo. Un grupo alquilo C₁-C₄ puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos, como se describe anteriormente para el grupo alquilo C₁-C₈.

- 40 “Alcoxi” es un grupo alquilo unido solamente a un oxígeno. Los grupos alcoxi a modo de ejemplo incluyen, metoxi (-OCH₃) y etoxi (-OCH₂CH₃). Un “alcoxi C₁-C₅” es un grupo alcoxi con 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alcoxi pueden estar no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos, como se describe anteriormente para los grupos alquilo.

- 45 “Alquenilo” es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono sp². Los ejemplos incluyen, etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂). Un “alquenilo C₂-C₈” es un hidrocarburo que contiene 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono sp².

- 50 “Alquinilo” es un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace carbono-carbono sp. Los ejemplos incluyen, acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH). Un “alquinilo C₂-C₈” es un hidrocarburo que contiene 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace carbono-carbono sp.

- 60 “Alquilenilo” se refiere a un radical hidrocarburo saturado, de cadena recta o ramificada o cíclica de 1-18 átomos de carbono y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los radicales alquilenilo típicos incluyen, metileno (-CH₂-), 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-) y similares.

- Un “alquilenilo C₁-C₁₀” es un grupo hidrocarburo de cadena recta, saturado de fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Los ejemplos de un alquilenilo C₁-C₁₀ incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

- 65 “Alquenileno” se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena recta o ramificada o cíclica de 2-18 átomos

de carbono y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alqueno parental. Los radicales alqueniлено típicos incluyen, 1,2-etileno (-CH=CH-).

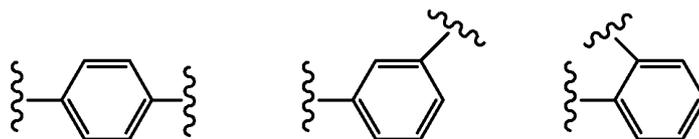
5 “Alquinileno” se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena recta o ramificada o cíclica de 2-18 átomos de carbono y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados por la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alquino parental. Los radicales alquinileno típicos acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH₂C≡C-) y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡C-).

10 “Ariло” se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Los ejemplos de grupos ariло incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antraceniло. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -ariло, -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; en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y ariло.

15 Un “ariло C₅-C₂₀” es un grupo ariло con 5 a 20 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Los ejemplos de grupos ariло C₅-C₂₀ incluyen, fenilo, naftilo y antraceniло. Un grupo ariло C₅-C₂₀ puede estar sustituido o no sustituido como se describe anteriormente para los grupos ariло. Un “ariло C₅-C₁₄” es un grupo ariло con 5 a 14 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Los ejemplos de grupos ariло C₅-C₁₄ incluyen, fenilo, naftilo y antraceniло. Un grupo ariло C₅-C₁₄ puede estar sustituido o no sustituido como se describe anteriormente para los grupos ariло.

20 Un “arileno” es un grupo ariло que tiene dos enlaces covalentes y pueden estar en configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras:

25



30 en las que el grupo fenilo puede estar no sustituido o sustituido con hasta cuatro grupos incluyendo, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -ariло, -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; en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y ariло.

35 “Ariलalquilo” se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza por un radical ariло. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, 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 aralquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alqueniло o alquinileno, del grupo aralquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y el resto ariло es de 5 a 14 átomos de carbono.

40 “Heteroarilalquilo” se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp³, se reemplaza por un radical heteroarilо. Los grupos heteroarilо típicos incluyen, 2-bencimidazolilmetilo, 2-furiletilo y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo grupos alcanilo, alqueniло o alquinileno, del grupo heteroarilalquilo es 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilо es de 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. El resto heteroarilо del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

50 “Alquilo sustituido”, “ariло sustituido” y “arilalquilo sustituido” significan alquilo, ariло y arilalquilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S-, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₂-C₁₈, ariло C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, grupo protector o resto profármaco. Los grupos alqueniло, alqueniло y alquinileno como se describen anteriormente también pueden sustituirse de forma similar.

60 “Heteroarilо” y “heterociclo” se refieren a un sistema de anillos en el que uno o más átomos del anillo es un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 3 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros

del anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

5 Los heterociclos a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta el presente), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

10 Los ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropirranilo, bis-tetrahidropirranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, chromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isochromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolínilo e isatinoilo.

25 A modo de ejemplo los heterociclos unidos a carbono se unen en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Todavía más normalmente, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazínilo, 3-pirazínilo, 5-pirazínilo, 6-pirazínilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

30 A modo de ejemplo los heterociclos 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, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina y posición 9 de un carbazol o β -carbolina. Todavía más normalmente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

40 Un "heterociclo C₃-C₈" se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo se reemplazan independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar no sustituido o sustituido con hasta siete grupos incluyendo, pero no limitado a, -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; en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

50 "Heterociclo- C₃-C₈" se refiere a un grupo heterociclo- C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo se reemplaza por un enlace. Un Heterociclo- C₃-C₈ puede estar no sustituido o sustituido con hasta seis grupos incluyendo, pero no limitado a, -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; en el que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

55 "Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen 3 a 6 átomos del anillo, todavía más normalmente 5 o 6 átomos del anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen 7 a 12 átomos del anillo, por ejemplo dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o 9 o 10 átomos del anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los 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.

60 Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros. Los carbociclos C₃-C₈ incluyen, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C₃-C₈ puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero no limitado a, -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; en el que cada R' se

selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

Un "carbociclo- C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo se reemplaza con un enlace.

5 "Conector" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, los conectores incluyen un radical divalente tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades de repetición de alquiloxi (por ejemplo polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenoamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida. En 10 diversas realizaciones, los conectores pueden comprender uno o más restos de aminoácidos, tales como valina, fenilalanina, lisina y homolisina.

15 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

20 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"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 propiedades físicas diferentes, por ejemplo puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

25 "Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

30 Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en el presente documento siguen generalmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina, a menudo, mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como una mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

45 "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido con otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes se conocen bien en la técnica y los ejemplos incluyen, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metansulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

50 La frase "grupo protector" se refiere a un sustituyente que se emplea comúnmente para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras que reaccionan otros grupos funcionales en el compuesto. 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. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991, o una edición posterior.

55 II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

60 En un aspecto, la invención se basa, en parte, en los anticuerpos que se unen a CD79b e inmunoconjugados que comprenden tales anticuerpos. Los anticuerpos y los inmunoconjugados de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o el tratamiento de cánceres positivo a CD79bs.

A. Anticuerpos anti-CD79b a modo de ejemplo

65 En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a CD79b. CD79b heterodimeriza con CD79a para formar CD79, un receptor restringido a linfocitos B. CD79b se expresa en diversos trastornos y cánceres relacionados con los linfocitos B, incluyendo diversos linfomas, tales como el linfoma no hodgkiniano.

Una secuencia precursora de CD79b humana de origen natural a modo de ejemplo, con secuencia señal (aminoácidos 1-28) se proporciona en SEQ ID NO: 40 y la secuencia CD79b madura correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 41 (que corresponde a los aminoácidos 29 a 229 de SEQ ID NO: 40).

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD79b une CD79b humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD79b une CD79b humano con una afinidad de ≤ 10 nM, o ≤ 5 nM, o ≤ 4 nM, o ≤ 3 nM, o ≤ 2 nM y opcionalmente $\geq 0,0001$ nM, o $\geq 0,001$ nM, o $\geq 0,01$ nM. Tales anticuerpos a modo de ejemplo incluyen huMA79bv28 y huMA79bv32, que se unen a CD79b humano con una afinidad de 0,44 nM y 0,24 nM, respectivamente. Véase, por ejemplo, el documento US 8.088.378 B2.

Ensayos

15 Si un anticuerpo anti-CD79b "se une con una afinidad de" ≤ 10 nM, o ≤ 5 nM, o ≤ 4 nM, o ≤ 3 nM, o ≤ 2 nM, se determina usando análisis de Scatchard, como se describe, por ejemplo, en el documento US 8.088.378 B2. Brevemente, un anticuerpo marcado con I^{125} se compete contra diluciones seriadas de anticuerpo sin marcar en presencia de células BJAB que expresan CD79b humano. Después de la incubación, las células se lavan y los recuentos del sedimento celular se leen con un contador gamma. Véase, por ejemplo, el documento US 8.088.378 B2. La afinidad de unión, K_D , de los anticuerpos puede determinarse de acuerdo con el análisis de Scatchard realizado utilizando un programa de ajuste de curva no lineal (véase, por ejemplo, Munson et al., Anal Biochem, 107: 220-239, 1980).

Anticuerpo MA79b y otras realizaciones

25 La invención desvela un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionados de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo o el inmunoconjugado comprende al menos uno de: (i) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o (ii) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 y 35.

35 La invención desvela un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionados de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo o el inmunoconjugado comprende al menos uno de: (i) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o (ii) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

45 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un inmunoconjugado que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias VH HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

60 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un inmunoconjugado que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un inmunoconjugado que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 y 35; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

- ID NO: 26. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 35. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
- En otro aspecto, un anticuerpo o inmunocombinado comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias VH HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17 y 23; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 24, y 35, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo o el inmunocombinado comprende al menos uno de: (i) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o (ii) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 35.
- En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un inmunocombinado que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo o el inmunocombinado comprende al menos uno de: HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 24 y 35. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un inmunocombinado que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
- En cualquiera de las realizaciones anteriores, un anticuerpo anti-CD79b está humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. En ciertas realizaciones, el marco aceptor humano es el marco humano VL kappa 1 (VL_{K1}) y/o el marco VH VH_{III}. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD79b humanizado comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 23; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD79b humanizado comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
- En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-CD79b que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a CD79b. En ciertas realizaciones, se han sustituido un total de 1 a 10 aminoácidos, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, se han sustituido un total de 1 a 5 aminoácidos, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se dan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR).
- Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VH de una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11 y 13, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VH de SEQ ID NO: 11, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la

SEQ ID NO: 23.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, una secuencia VL que tiene al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-CD79b que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a CD79b. En ciertas realizaciones, se han sustituido un total de 1 a 10 aminoácidos, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, se han sustituido un total de 1 a 5 aminoácidos, insertado y/o eliminado en SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se dan en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VL de una cualquiera de las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12 y 14, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VL de SEQ ID NO: 12, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 35; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de cadena pesada y cadena ligera en SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 37, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de cadena pesada y cadena ligera en SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 37, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de cadena pesada y cadena ligera en SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 54, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias de cadena pesada y cadena ligera en SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 37, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de esas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo o inmunoconjugado que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b que comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 11 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 12.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-CD79b de acuerdo con cualquiera de las anteriores realizaciones es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-CD79b es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud sustancialmente completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En cualquiera de los inmunoconjugados descritos anteriormente, el anticuerpo puede conjugarse a un resto de fármaco. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En algunas de dichas realizaciones, el agente citotóxico es un derivado de nemorubicina, tal como PNU-159682. Se analizan diversos derivados de nemorubicina a modo de ejemplo en el presente documento.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, como se describe en las Secciones 1-7 a continuación.

1. Afinidad de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM y opcionalmente es ≥ 10⁻¹³ M. (por

ejemplo 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una realización, Kd se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión de solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno sin marcar, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, placas multi-pocillo MICROTITER[®] (Thermo Scientific) se recubren durante toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato sódico 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 n.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba después durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 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). La solución después se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20[®]) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20[™]; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al 20 % de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, se mide la Kd usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie usando 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, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, a pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones seriadas dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20[™]) (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIACORE[®] Software de evaluación versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd= se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la tasa on excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces puede determinarse la tasa on usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, pase de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, a pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO[™] serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y fragmentos scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (SpringerVerlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458. Para el análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítopos de unión a receptor silvestre y que tienen vida media *in vivo* aumentada, véase la patente de EE.UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y los tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo pueden fabricarse por diversas técnicas, incluyendo la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fagos), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que la clase o la subclase se ha cambiado de aquella del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a humanos, reteniendo la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, CDR, (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano y los FR (o porciones de los mismos) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá además al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos de FR en un anticuerpo humano se sustituyen con correspondientes restos de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan las HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o la afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para fabricarlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) y se describen además, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 86:10029-10033 (1989); patentes de EE.UU. n.º 5 y 821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (que describen injertos de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (que describen "la re-formación de superficie"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (que describen "arrastré de FR"); y Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) y Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" al arrastre de FR).

Las regiones marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:4285 (1992); y Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (sómáticamente mutadas) o regiones marco de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de bibliotecas de FR de detección (véase, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a desafío antigénico. Tales animales contienen normalmente todos o una porción de los loci de inmunoglobulinas humanas, que reemplazan los loci de inmunoglobulinas endógenas, o que están presentes extracromosómicamente o integradas aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulinas endógenas generalmente se han inactivado. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE.UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE.UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, combinando con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden fabricarse por métodos basados en hibridoma. Se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai

Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (que describen hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

5 Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominios variables de clones Fv seleccionados de bibliotecas de visualización de fagos derivados de humanos. Tales secuencias de dominios variables pueden combinarse después con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

10 **5. Anticuerpos derivados de bibliotecas**

Los anticuerpos pueden aislarse explorando bibliotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce en la técnica diversos métodos para generar bibliotecas de visualización de fagos y explorar tales bibliotecas para anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Tales métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en los McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NY, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de visualización de fagos, los repertorios de los genes VH y VL se clonan separadamente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse para el fago de unión de antígeno como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos normalmente visualizan fragmentos de anticuerpos, bien como fragmentos de Fv de cadena sencilla (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin requerir la construcción de hibridomas. Como alternativa, el repertorio indiferenciado puede clonarse (por ejemplo, de humanos) para proporcionar una única fuente de anticuerpos a un amplio intervalo de no autoantígenos y también autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas indiferenciadas también pueden fabricarse sintéticamente clonando segmentos de genes V sin reordenar de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la Patente de EE.UU. n.º 5.750.373 y las Publicaciones de Patentes de EE.UU. n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos aislados de las bibliotecas de anticuerpos humanas se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

40 **6. Anticuerpos multiespecíficos**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por CD79b y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de CD79b. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan CD79b. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para fabricar anticuerpos multiespecíficos incluyen, co-expresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulinas que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y el diseño por ingeniería "nudos en huecos" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden fabricarse diseñando por ingeniería efectos de dirección electrostática para fabricar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

65 Los anticuerpos diseñados por ingeniería con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo el documento US

2006/0025576A1).

El anticuerpo o el fragmento en el presente documento también incluye un "FAB de actuación dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CD79b así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de anticuerpo

En ciertas realizaciones, se contemplan las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y los FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Los cambios más sustanciales se proporcionan en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones a modo de ejemplo", y como se describe además a continuación con referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos detectaos para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejorados.

TABLA 1

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	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)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 5 Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para su estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo parental y/o tendrán ciertas propiedades biológicas sustancialmente retenidas del anticuerpo parental. Una variante sustitucional a modo de ejemplo es un anticuerpo de afinidad madura, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de afinidad basadas en visualización de fagos tales como aquellas descritas en el presente documento. Brevemente, uno o más restos de HVR se mutan y los anticuerpos variantes se visualizan en fagos y se exploran para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).
- 10
- 15 Las alteraciones (por ejemplo, sustituciones) pueden realizarse en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden realizarse en "puntos calientes" de las HVR, es decir, restos codificados por codones que se someten a mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDRs (a-CDR), ensayándose la variante de VH o VL resultante para la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de la afinidad construyendo y reseleccionando de bibliotecas secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NY, (2001)). En algunas realizaciones de la maduración de afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, intercambio de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. Después se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca después se explora para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de HVR implicados en la unión a antígenos pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado de detección de alanina. Normalmente se marcan como diana CDR-H3 y CDR-L3 en particular.
- 20
- 25
- 30 En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden ocurrir dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo a unirse al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión pueden realizarse en las HVR. Tales alteraciones pueden ser fuera de los "puntos calientes" de las HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- 35

Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que puede marcarse como diana para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de detección de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se afecta. Las sustituciones adicionales pueden introducirse en las localizaciones de aminoácidos que demuestran la sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o adicionalmente, se usa una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos pueden marcarse como diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden detectarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

40

45

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de uno resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

50

55

b) Variantes de glucosilación

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o disminuir el grado en el que se glucosila un anticuerpo. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede lograrse adecuadamente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que se creen o se retiren uno o más sitios de glucosilación.

60

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos comprenden normalmente un oligosacárido biantenarico que se fija generalmente por un enlace N al Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil

65

glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura biantenaria de oligosacárido. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo pueden realizarse para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

5 En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras de manosa complejas, híbridas y altas) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto asparagina localizado en la posición aproximada 297 en la región Fc (numeración Eu de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente \pm 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de EE.UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; el documento WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Sol. de Pat. de EE.UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares suprimidas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO suprimidas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

30 Las variantes de anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la patente de EE.UU. n.º 6.602.684 (Umana et al.); y el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); en el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y en el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

40 **c) Variantes de la región Fc**

En ciertas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la hace una candidata deseable para aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante ya que ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. 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 al receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero retiene la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Los ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de EE.UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citotóxicas naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel desvelado en Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a Clq para confirmar que

5 el anticuerpo es incapaz de unir Clq y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a Clq y C3c en el documento WO 2006/029879 y el documento WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y aclaramiento *in vivo*/vida media usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

10 Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de EE.UU. n.º 6.737.056). Tales mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante Fc "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 a alanina (Patente de EE.UU. n.º 7.332.581).

15 Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión a FcR mejorada o disminuida. (Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.737.056; documento WO 2004/056312 y Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

20 En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos).

25 En algunas realizaciones, las alteraciones se realizan en la región Fc que resultan en unión a Clq y/o Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) alteradas (es decir, bien mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551, en el documento WO 99/51642 y en Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

30 Los anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Aquellos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Tales variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del resto de la región Fc 434 (Patente de EE.UU. n.º 7.371.826).

35 Véase también Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); patente de EE.UU. n.º 5.648.260; patente de EE.UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo diseñadas por ingeniería con cisteína

40 En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos diseñados por ingeniería con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se dan en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo estos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de esta manera en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los ejemplos no limitantes de cadenas pesadas y cadenas ligeras diseñadas por ingeniería con cisteína de un anticuerpo huMA79bv28 se muestran en la Figura 4 (SEQ ID NO: 39, 54 y 55). Los anticuerpos diseñados por ingeniería con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

55 En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen pero no se limitan a polímeros hidrosolubles. Los ejemplos de polímeros hidrosolubles incluyen, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a mejorarse, si

el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que puede calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, longitudes de onda que no calientan las células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que las células proximales al anticuerpo-resto no proteico mueren.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Los anticuerpos pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en patente EE.UU. n.º 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b descrito en el presente documento. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden tal ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende tal ácido nucleico. En una realización de este tipo, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula YO, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo anti-CD79b, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o el medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD79b, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación adicional y/o la expresión en una célula hospedadora. Tal ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NY, 2003); págs. 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Los hospedadores adecuados para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse en conjunción con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también pueden utilizarse como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse plantas de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamíferos que están adaptadas a crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por sv40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A);

células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MCR 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células DHFR⁺ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:4216 (1980)); y las

5 líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

10 Los anticuerpos anti-CD79b proporcionados en el presente documento pueden identificarse, detectarse por o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversas pruebas conocidas en la técnica.

15 En un aspecto, se ensaya un anticuerpo para su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, BIACore[®], FACS o transferencia Western.

20 En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento para unirse a CD79b. En ciertas realizaciones, un anticuerpo competente tal se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une por un anticuerpo descrito en el presente documento. Los métodos a modo de ejemplo detallados para mapear un epítipo al que un anticuerpo se une se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

25 En un ensayo de competición a modo de ejemplo, se incubaba CD79b inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a CD79b (por ejemplo, anticuerpo MA79b murino, anticuerpo MA79b.v17 humanizado y/o anticuerpo MA79b.v18 humanizado y/o MA79b.v28 humanizado y/o MA79b.v32 humanizado) y un segundo anticuerpo sin marcar que se está ensayando para su capacidad de competir con el primer anticuerpo para unirse a CD79b. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control,

30 CD79b inmovilizado se incubaba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a CD79b, se retira el exceso de anticuerpo sin unir y se mide la cantidad de marca asociada al CD79b inmovilizado. Si la cantidad de marca asociada al CD79b inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo relativa a la muestra control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la

35 unión 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. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

D. Inmunoconjugados

40 La invención también desvela inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD79b en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos (es decir, un radioconjugado).

50 Los inmunoconjugados permiten el envío de un resto de fármaco a un tumor y, en algunas realizaciones la acumulación intracelular de los mismos, donde la administración sistémica de fármacos sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales (Polakis P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387).

55 Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son moléculas quimioterapéuticas marcadas como diana que combinan propiedades tanto de anticuerpos como de fármacos citotóxicos marcando como diana fármacos citotóxicos potentes a células tumorales que expresan antígenos (Teicher, B.A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004), potenciando de esta manera el índice terapéutico maximizando la efectividad y minimizando la toxicidad hacia las no dianas (Carter, P.J. and Senter P.D. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107).

60 Los compuestos ADC de la invención incluyen aquellos con actividad anticáncer. En algunas realizaciones, los compuestos ADC incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido covalentemente, al resto farmacológico. En algunas realizaciones, el anticuerpo está covalentemente unido al resto farmacológico a través de un conector. Los conjugados anticuerpo fármaco (ADC) de la invención transportan selectivamente una dosis eficaz de un fármaco a un tejido tumoral por lo que puede lograrse mayor selectividad, es decir una dosis efectiva más baja, mientras que se aumenta el índice terapéutico ("ventana terapéutica").

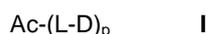
65 El resto farmacológico (D) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) puede incluir cualquier compuesto, resto o

grupo que tenga un efecto citotóxico o citostático. Los restos farmacológicos a modo de ejemplo incluyen, nemorubicina y sus derivados, tales como PNU-159682, que tienen actividad citotóxica. Los ejemplos de tales inmunoconjugados se analizan con mayor detalle a continuación.

5 1. Conjugados Anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo

Una realización a modo de ejemplo de un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ac) que marca como diana una célula tumoral, un resto farmacológico (D) y un resto conector (L) que fija Ac a D. En algunas realizaciones, el anticuerpo se fija al resto conector (L) a través de uno o más restos de aminoácidos, tales como lisina y/o cisteína.

Un ADC a modo de ejemplo tiene la Fórmula I:



donde p es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, el número de restos farmacológicos que puede conjugarse a un anticuerpo se limita por el número de restos cisteína libres. En algunas realizaciones, los restos cisteína libres se introducen en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo por los métodos descritos en el presente documento. Los ADC a modo de ejemplo de Fórmula I incluyen, anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos cisteína diseñados por ingeniería (Lyon, R. et al (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). En algunas realizaciones, uno o más restos cisteína libres ya están presentes en un anticuerpo, sin el uso de diseñar por ingeniería, en cuyo caso los restos cisteína libres existentes pueden usarse para conjugar el anticuerpo a un fármaco. En algunas realizaciones, un anticuerpo se expone a condiciones reductoras antes de la conjugación del anticuerpo para generar uno o más restos cisteína libres.

a) Conectores a modo de ejemplo

Un "Conector" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que puede usarse para conectar uno o más restos farmacológicos (D) a un anticuerpo (Ac) para formar un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) pueden prepararse usando un Conector que tiene funcionalidades reactivas para unirse covalentemente al fármaco y al anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ac) puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un conector o un intermedio fármaco-conector para fabricar un ADC.

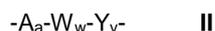
En un aspecto, un conector tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con una cisteína libre presente en un anticuerpo para formar un enlace covalente. Tales funcionalidades reactivas a modo de ejemplo incluyen maleimida, haloacetamidas, α -haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Véase, por ejemplo, el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773 y los Ejemplos en el mismo.

En algunas realizaciones, un conector tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con un grupo electrófilo presente sobre un anticuerpo. Tales grupos electrófilos a modo de ejemplo incluyen, grupos carbonilo aldehído y cetona. En algunas realizaciones, un heteroátomo de la funcionalidad reactiva del conector puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpo. Tales funcionalidades reactivas a modo de ejemplo incluyen, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida.

Un conector puede comprender uno o más componentes conectores. Los componentes conectores a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrullina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxicarbonilo (un "PAB"), 4-(2-piridiltio) pentanoato de N-succinimidilo ("SPP") y ciclohexan-1 carboxilato de 4-(N-maleimidometilo) ("MCC"). Diversos componentes conectores se conocen en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

Un conector puede ser un "conector escindible", facilitando la liberación de un fármaco. Los conectores escindibles a modo de ejemplo incluyen conectores lábiles a ácidos (por ejemplo, que comprenden hidrazona), conectores sensibles a proteasa (por ejemplo, sensibles a peptidasa), conectores fotolábiles o conectores que contienen disulfuro (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); documento US 5208020).

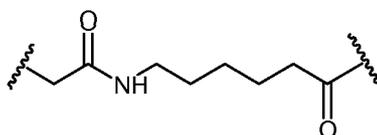
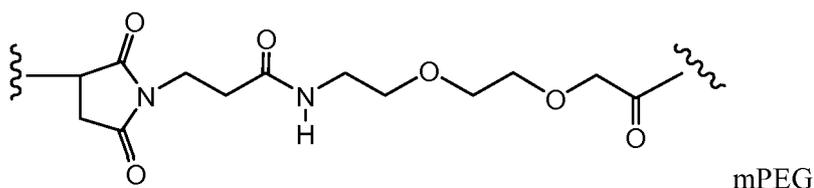
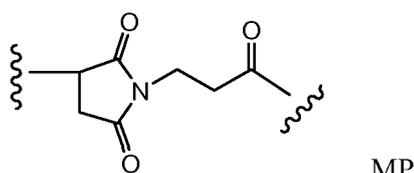
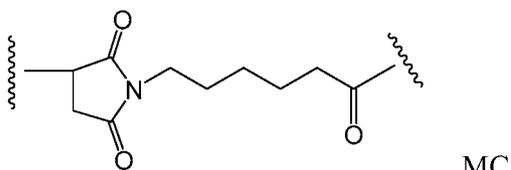
En ciertas realizaciones, un conector tiene la siguiente Fórmula II:



en la que A es una "unidad extensora" 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 o 2. Un ADC que comprende el conector de Fórmula II tiene la Fórmula I(A): $\text{Ac-(A}_a\text{-W}_w\text{-Y}_y\text{-D)}_p$, en la que Ac, D y p se definen como anteriormente para la

Fórmula I. Las realizaciones a modo de ejemplo de tales conectores se describen en la Patente de EE.UU. n.º 7.498.298.

- 5 En algunas realizaciones, un componente conector comprende una "unidad extensora" (A) que conecta un anticuerpo a otro componente conector o a un resto farmacológico. Las unidades extensoras a modo de ejemplo se muestran a continuación (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo, fármaco o componentes conectores adicionales):



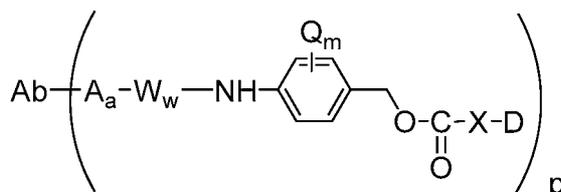
- 10 En algunas realizaciones, un componente conector comprende una "unidad de aminoácido" (W). En algunas de dichas realizaciones, la unidad de aminoácidos permite la escisión del conector por una proteasa, facilitando de esta manera la liberación del fármaco del inmunocombinado tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como las enzimas lisosómicas (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Las unidades de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Los dipéptidos a modo de ejemplo incluyen, valina-citulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); fenilalanina-homolisina (phe-homolys); y N-metil-valina-citulina (Me-val-cit). Los tripéptidos a modo de ejemplo incluyen, glicina-valina-citulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender restos de aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos minoritarios y/o análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como la citulina. Las unidades de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

- 25 Típicamente, los conectores tipo péptido pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con un método de síntesis de fase líquida (por ejemplo, E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, Academic Press).

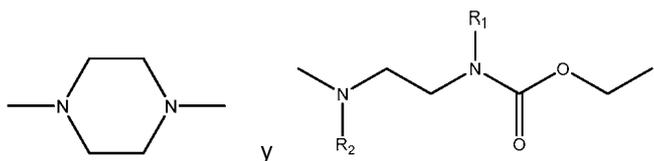
- 30 En algunas realizaciones, un componente conector comprende una "unidad espaciadora" (Y) que conecta el anticuerpo a un resto farmacológico, bien directamente o a través de una unidad extensora y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser "auto-inmolativa" o "no auto-inmolativa". Una unidad espaciadora "no auto-inmolativa" es una en la que parte o toda la unidad espaciadora se mantiene unida al resto farmacológico tras la escisión del ADC. Los ejemplos de unidades espaciadoras no auto-inmolativas incluyen, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. En algunas realizaciones, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a célula tumoral resulta en la liberación de un resto glicina-glicina-fármaco del resto del ADC. En algunas de dichas realizaciones, el

resto glicina-glicina-fármaco se somete a una etapa de hidrólisis en la célula tumoral, escindiendo de esta manera la unidad espaciadora glicina-glicina del resto farmacológico.

Una unidad espaciadora "auto-inmolativa" permite la liberación del resto farmacológico. En ciertas realizaciones, una unidad espaciadora de un conector comprende una unidad p-aminobencilo. En algunas de dichas realizaciones, un alcohol p-aminobencílico se une a una unidad de aminoácidos a través de un enlace amida y se produce un carbamato, un metilcarbamato o un carbonato entre el alcohol bencílico y el fármaco (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103). En algunas realizaciones, la unidad espaciadora comprende p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En algunas realizaciones, un ADC que comprende un conector auto-inmolativo tiene la estructura:



en la que Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; X puede ser una o más unidades espaciadoras adicionales o puede estar ausente; y p varía de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p varía de 1 a 10, de 1 a 7, de 1 a 5 o de 1 a 4. Las unidades espaciadoras X a modo de ejemplo incluyen:

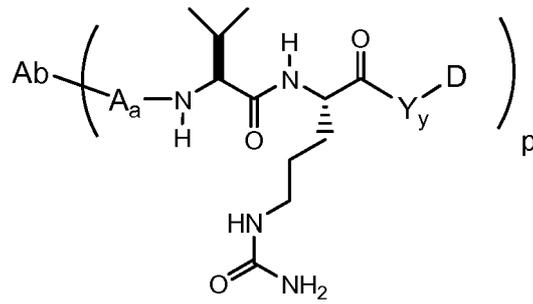


en las que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de H y alquilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, R₁ y R₂ son cada uno -CH₃.

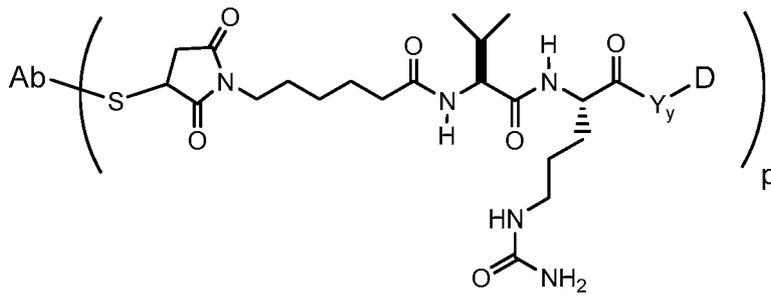
Otros ejemplos de espaciadores auto-inmolativos incluyen, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Patente de EE.UU. n.º 7.375.078; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. En algunas realizaciones, pueden usarse espaciadores que se someten a ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como las amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). La unión de un fármaco al carbono α de un resto glicina es otro ejemplo de un espaciador auto-inmolativo que puede ser útil en ADC (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

En algunas realizaciones, el conector L puede ser un conector tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto farmacológico a un anticuerpo a través de una ramificación de un resto conector multifuncional (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los conectores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, donde un anticuerpo lleva solamente un grupo tiol cisteína reactivo, puede unirse una multitud de restos farmacológicos a través de un conector dendrítico.

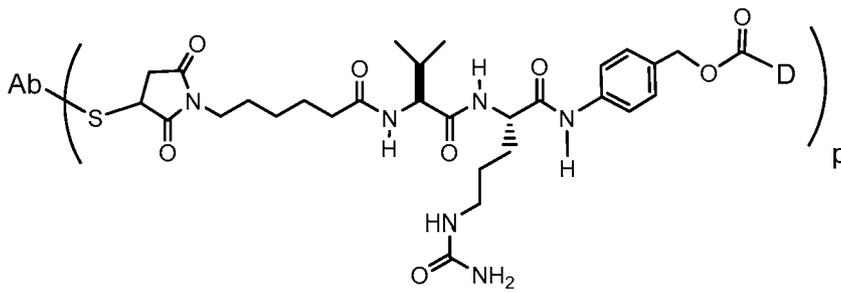
Los conectores a modo de ejemplo se muestran a continuación en el contexto de un ADC de Fórmula I:



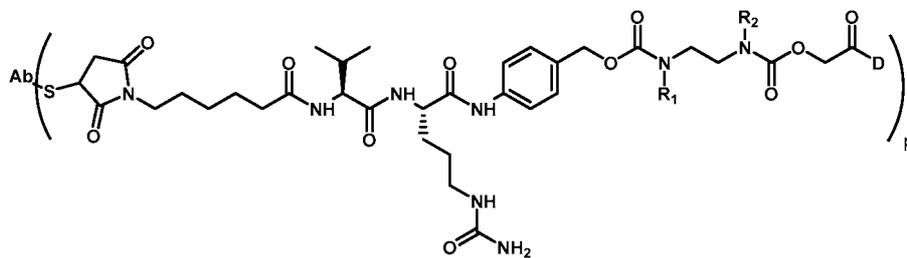
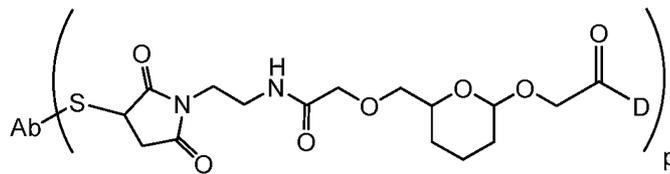
val-cit



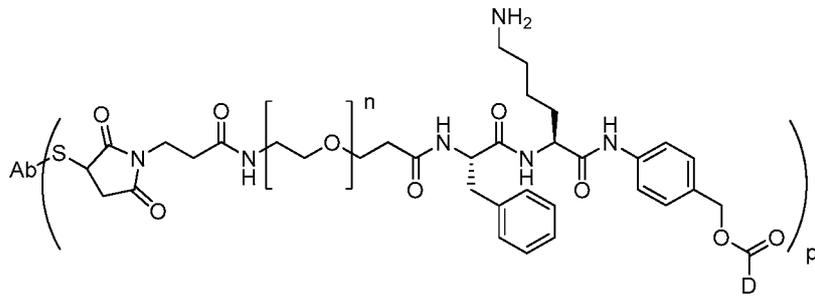
MC-val-cit



MC-val-cit-PAB



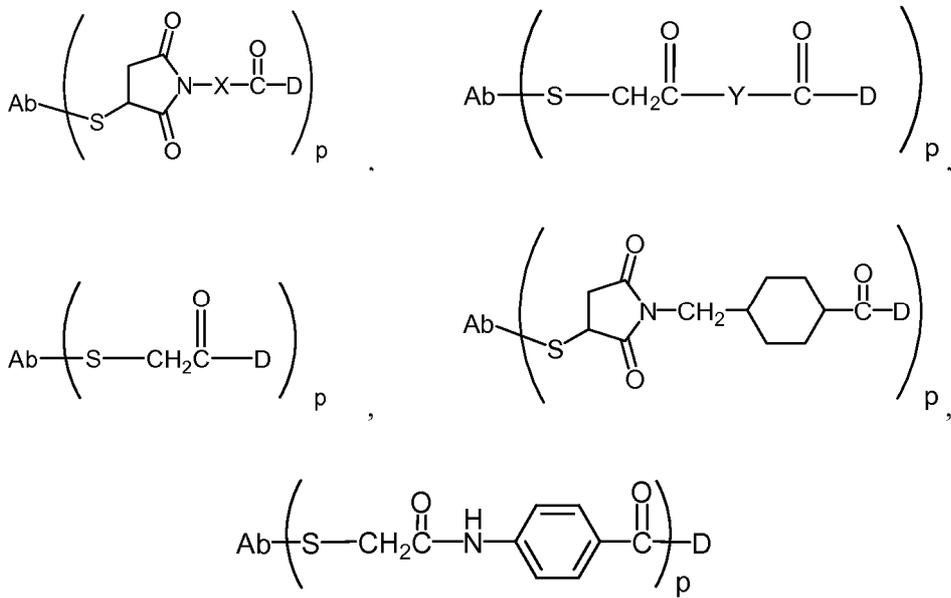
en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de H y alquilo C_1 - C_6 . En algunas realizaciones, R_1 y R_2 son cada uno - CH_3 .



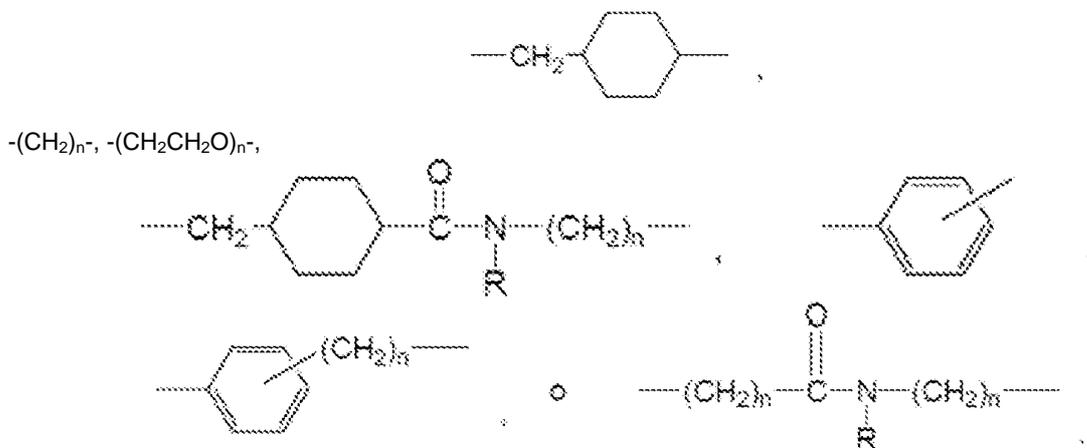
Phe-homoLys-PAB-Ab; en la que n es 0 a 12. En algunas realizaciones, n es 2 a 10. En algunas realizaciones, n es 4 a 8.

5

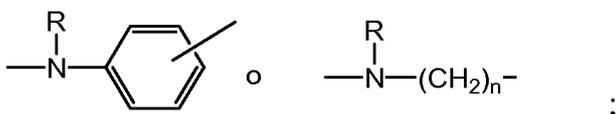
Los ADC a modo de ejemplo adicionales incluyen las estructuras:



10 donde X es:



Y es:

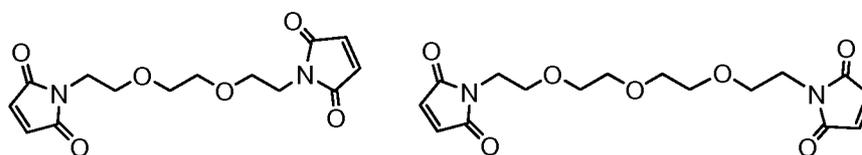


20

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

En algunas realizaciones, un conector está sustituido con grupos que modulan la solubilidad y/o la reactividad. Como un ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo conector y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo conector con el anticuerpo y/o el resto farmacológico o facilitar la reacción de acoplamiento de Ac-L (intermedio anticuerpo-conector) con D o D-L (intermedio fármaco-conector) con Ac, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC. En algunas realizaciones, una porción del conector está acoplada al anticuerpo y una porción del conector está acoplada al fármaco y entonces el Ac-(porción conectora)^a está acoplado al fármaco (porción conectora)^b para formar el ADC de Fórmula I.

Los compuestos de la invención contemplan expresamente ADC preparados con los siguientes reactivos conectores: bis-maleimido-trioxietilenglicol (BMPEO), éster de N-(β-maleimidopropilo)xi)-N-hidroxi succinimida (BMPS), éster de N-(ε-maleimidocaproilo)xi) succinimida (EMCS), éster de N-[γ-maleimidobutirilo]xi)succinimida (GMBS), 1,6-hexan-bis-vinilsulfona (HBVS), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzoi)-N-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida del ácido 4-(4-N-Maleimidofenil)butírico (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de succinimidilo (SBAP), yodoacetato de succinimidilo (SIA), (4-yodoacetil)aminobenzoato de succinimidilo (SIAB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), 6-[(beta-maleimidopropionamido)hexanoato] de succinimidilo (SMPH), iminotiolano (IT), sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato (SVSB) e incluyendo reactivos bis-maleimida: ditiobismaleimidoetano (DTME), 1,4-Bismaleimidobutano (BMB), 1,4 Bismaleimidil-2,3-dihidroxitbutano (BMDB), bismaleimidohexano (BMH), bismaleimidoetano (BMOE), BM(PEG)₂ (mostrado a continuación) y BM(PEG)₃ (mostrado a continuación); derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidilo de suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoi) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilenediamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). En algunas realizaciones, los reactivos bis-maleimida permiten la fijación del grupo tiol de una cisteína en el anticuerpo a un resto farmacológico que contiene tiol, un conector o un intermedio conector-fármaco. Otros grupos funcionales que son reactivos con grupos tiol incluyen, yodoacetamida, bromoacetamida, piridina de vinilo, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

Ciertos reactivos conectores útiles pueden obtenerse de diversas fuentes comerciales, tales como Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO) o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en la técnica; por ejemplo, en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; el documento US 6214345; el documento WO 02/088172; el documento US 2003130189; el documento US2003096743; el documento WO 03/026577; el documento WO 03/043583; y el documento WO 04/032828.

El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO94/11026.

b) Restos farmacológicos a modo de ejemplo

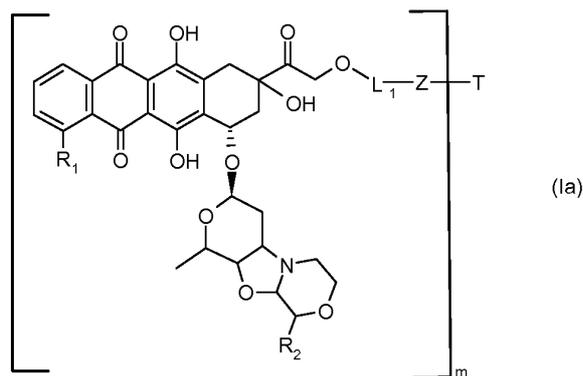
Un ADC puede comprender una antraciclina. Las antraciclinas son compuestos antibióticos que exhiben actividad citotóxica. Aunque no se pretende quedar ligado a ninguna teoría particular, los estudios han indicado que las antraciclinas pueden funcionar matando células mediante un número de diferentes mecanismos, incluyendo: 1) intercalación de las moléculas de fármaco en el ADN de la célula de esta manera inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de ADN; 2) producción por el fármaco de radicales libres que después reaccionan con macromoléculas celulares para provocar daño a las células y/o 3) interacciones de las moléculas de fármaco con la membrana celular (véase, por ejemplo, C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" en Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. en las páginas 97-102). Debido a su potencial citotóxico las antraciclinas se han usado en el tratamiento

de numerosos cánceres tales como leucemia, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de ovario y sarcomas (véase, por ejemplo, P.H- Wiernik, en Anthracycline: Current Status And New Developments p 11).

- 5 Las antraciclinas a modo de ejemplo incluyen doxorubicina, epirubicina, idarubicina, daunomicina, nemorubicina y derivados de las mismas. Se han preparado y estudiado inmunoconjugados y profármacos de daunorubicina y doxorubicina (Kratz et al (2006) *Current Med. Chem.* 13:477-523; Jeffrey et al (2006) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362; Torgov et al (2005) *Bioconj. Chem.* 16:717-721; Nagy et al (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:829-834; Dubowchik et al (2002) *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532; King et al (2002) *J. Med. Chem.* 45:4336-4343; documento EP 0328147; documento US 6630579). El conjugado fármaco-anticuerpo doxorubicina-BR96 reacciona específicamente con el antígeno de Lewis-Y asociado al tumor y se ha evaluado en estudios de fase I y II (Saleh et al (2000) *J. Clin. Oncology* 18:2282-2292; Ajani et al (2000) *Cancer Jour.* 6:78-81; Tolcher et al (1999) *J. Clin. Oncology* 17:478-484).
- 10
- 15 El PNU-159682 es un metabolito (o derivado) potente de la nemorubicina (Quintieri, et al. (2005) *Clinical Cancer Research* 11(4):1608-1617). La nemorubicina es un análogo semisintético de la doxorubicina con un grupo 2-metoximorfolino en el amino glucósido de la doxorubicina y ha estado en evaluación clínica (Grandi et al (1990) *Cancer Treat. Rev.* 17:133; Ripamonti et al (1992) *Brit. J. Cancer* 65:703;), incluyendo pruebas de fase II/III para carcinoma hepatocelular (Sun et al (2003) *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22, Abs 1448; Quintieri (2003) *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 44:1a Ed, Abs 4649; Pacciarini et al (2006) *Four. Clin. Oncology* 24:14116).
- 20

Se muestra un ADC a modo de ejemplo que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina en la Fórmula

25



en la que R_1 es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o metoxi y R_2 es un grupo alcoxi C_1-C_5 ; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 L_1 y Z juntos son un conector (L) como se describe en el presente documento;

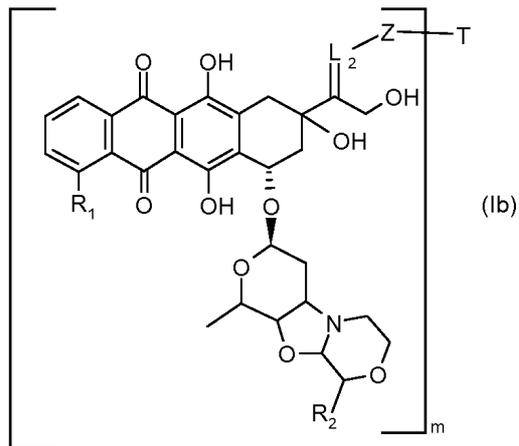
T es un anticuerpo (Ac) como se describe en el presente documento; y

m es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, m es 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5 o 1 a 4.

35

En algunas realizaciones, R_1 y R_2 son ambos metoxi (-OMe).

Se muestra un ADC a modo de ejemplo adicional que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina en la Fórmula Ib:



en la que R₁ es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o metoxi y R₂ es un grupo alcoxi C₁-C₅; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

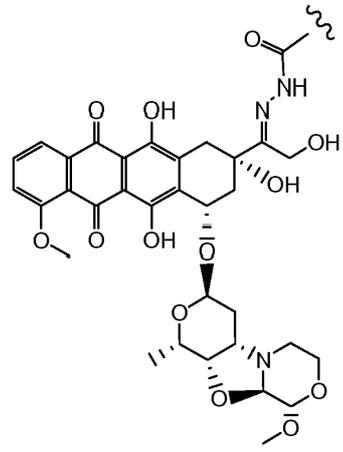
5 L₁ y Z juntos son un conector (L) como se describe en el presente documento;

T es un anticuerpo (Ac) como se describe en el presente documento; y

m es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, m es 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5 o 1 a 4.

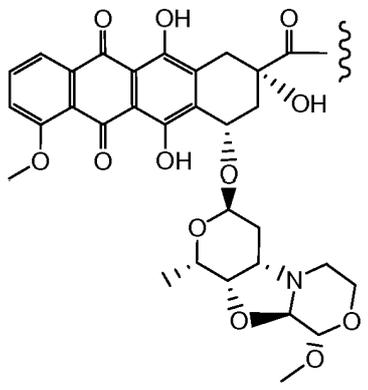
10 En algunas realizaciones, R₁ y R₂ son ambos metoxi (-OMe).

En algunas realizaciones, el componente nemorubicina de un ADC que contiene nemorubicina es PNU-159682. En algunas de dichas realizaciones, la porción de fármaco del ADC puede ser una de las siguientes estructuras:



15

o



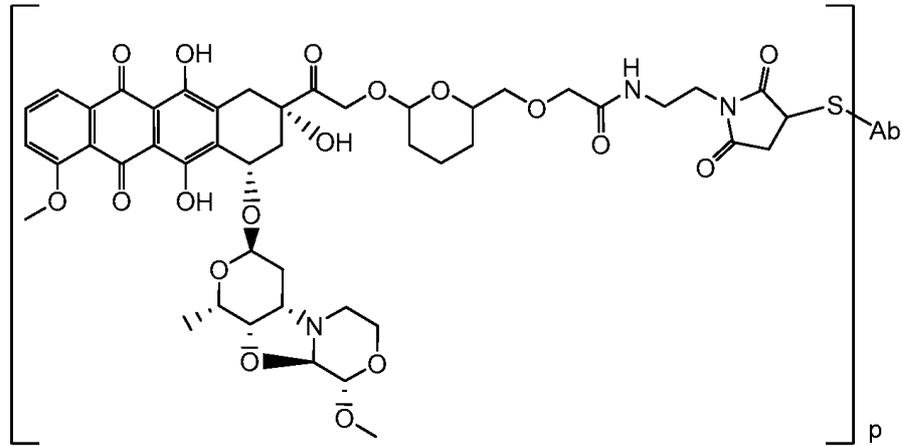
20 en las que la línea ondulada indica la unión al conector (L).

Las antraciclinas, incluyendo PNU-159682, pueden conjugarse a los anticuerpos a través de varios sitios de

conexión y diversos conectores (documento US 2011/0076287; documento WO2009/099741; documento US 2010/0034837; documento WO 2010/009124), incluyendo los conectores descritos en el presente documento.

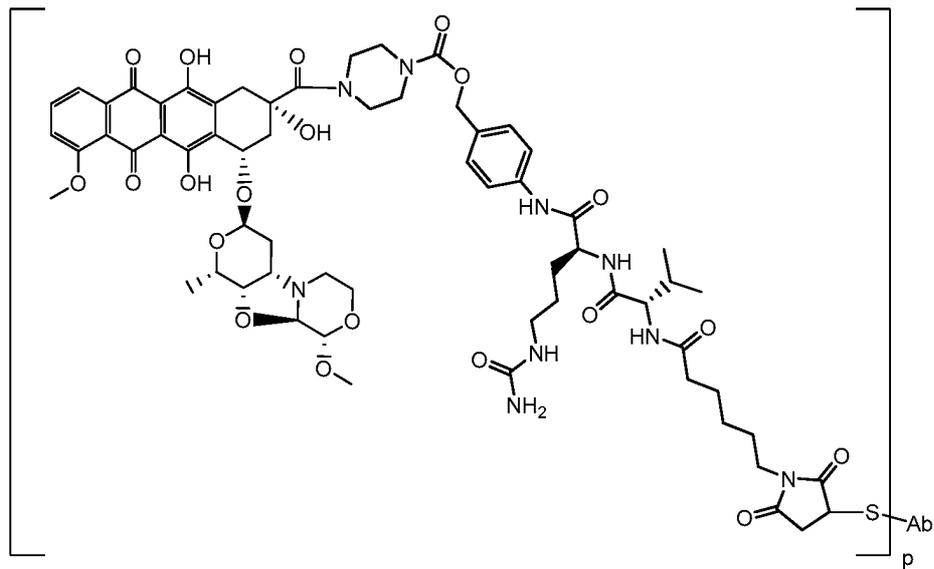
Los ADC a modo de ejemplo que comprenden una nemorubicina y un conector incluyen,

5



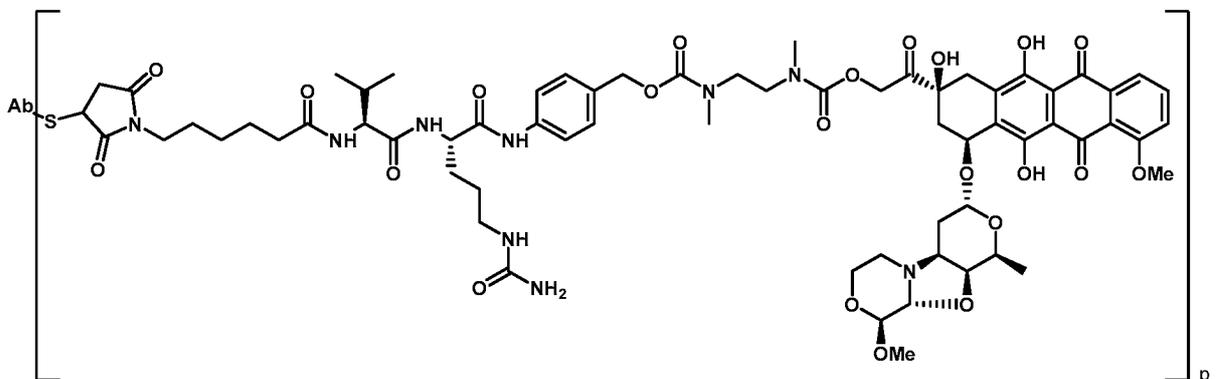
PNU-159682 maleimida acetal-Ab;

10

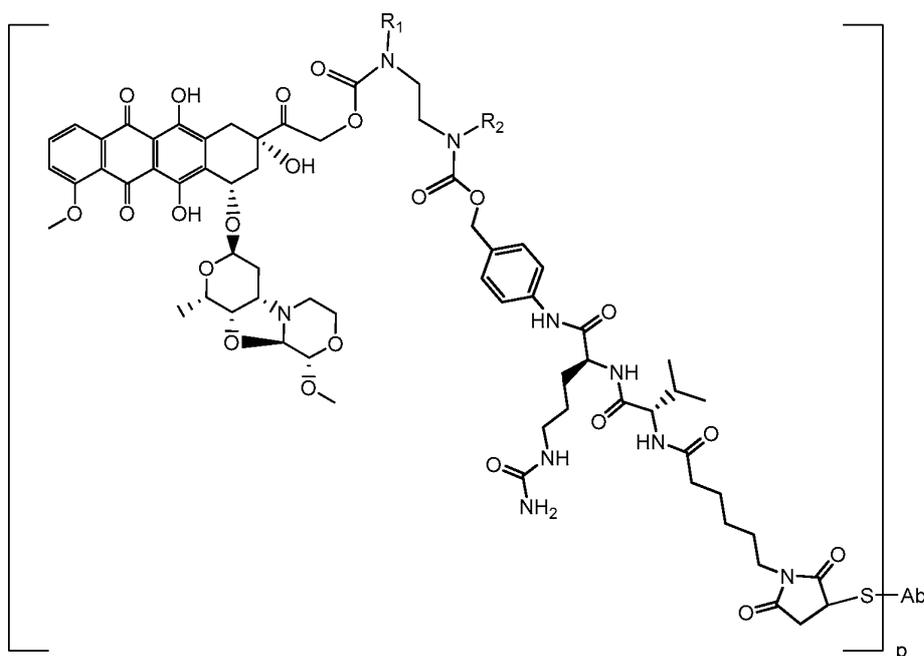


PNU-159682-val-cit-PAB-Ab;

15

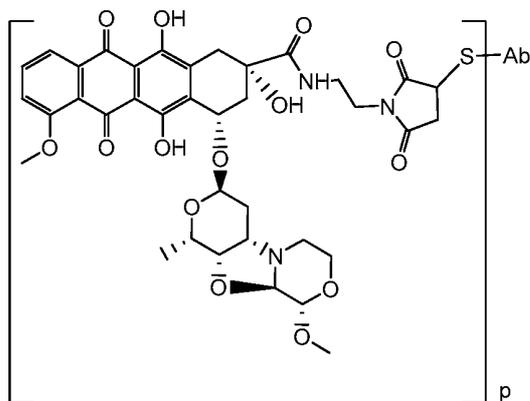


PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador-Ab;



PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador(R^1R^2)-Ab, en el que:

- 5 R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H y alquilo C_1 - C_6 ; y



PNU-159682-maleimida-Ab.

- 10 El conector de PNU-159682 maleimida acetal-Ab es lábil al ácido, mientras que los conectores PNU-159682-val-cit-PAB-Ab, PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador-Ab y PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador(R^1R^2)-Ab son escindibles por proteasa.

15 c) Carga de fármaco

- La carga de fármaco se representa por p, el número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 restos de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugadas con un intervalo de restos farmacológicos, de 1 a 20.
- 20 El número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de ADC en términos de p también puede determinarse. En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización de ADC homogéneos donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco pueden lograrse por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

- 25 Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, p puede limitarse por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, donde la unión es un tiol de cisteína, como en ciertas realizaciones a modo de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un conector. En ciertas realizaciones, una carga mayor de fármaco, por ejemplo $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad
- 30

celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco promedio por aun ADC varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. De hecho, se ha mostrado que para ciertos ADC, la relación óptima de restos farmacológicos por anticuerpo puede ser menos de 8 y puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 (documento US 7498298).

En ciertas realizaciones, se conjugan menos que el máximo teórico de restos farmacológicos a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, restos lisina que no reaccionan con el intermedio fármaco-conector o el reactivo conector, como se analiza a continuación. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan conectarse a un resto farmacológico; de hecho la mayoría de restos tiol de cisteína en los anticuerpos existe como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones de reducción parcial o total, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturizantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación fármaco/anticuerpo de un ADC puede controlarse de diferentes maneras y por ejemplo: (i) limitando el exceso molar de intermedio fármaco-conector o reactivo conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de reacción de conjugación y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de tiol de cisteína.

Ha de entenderse que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio fármaco-conector o reactivo conector, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de uno o más restos farmacológicos unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla por un ensayo de anticuerpo ELISA dual, que es específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, por ejemplo cromatografía de interacción hidrófoba (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 N.º 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo, 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen N.º 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 27-31 de marzo, 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga puede aislarse de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

d) Ciertos métodos para preparar inmunoconjugados

Un ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo conector bivalente para formar Ac-L a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo conector bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. Los métodos a modo de ejemplo para preparar un ADC de Fórmula I a través de la última ruta se describen en el documento US 7498298.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina en cadenas laterales, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadenas laterales, por ejemplo cisteína y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos conectores y reactivos conectores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos conectores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de tal manera que el anticuerpo esté completa o parcialmente reducido. Cada puente de cisteína formará de esta manera, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la modificación de restos lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar restos lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), resultando en la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos también pueden introducirse en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos cisteína (por ejemplo, preparando variantes de anticuerpos que comprendan uno o más restos de aminoácidos cisteína no nativos).

Los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse por reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un reactivo conector o fármaco. Los grupos nucleófilos útiles en un reactivo conector incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo

se modifica para introducir restos electrófilos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo conector o el fármaco. En otra realización, los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos conectores o los restos farmacológicos. Los grupos de base de Schiff imina
 5 resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo por reactivos borohidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o bien meta-peryodato sódico pueden producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos amina apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate
 10 Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen restos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, resultando en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Un aldehído tal puede hacerse reaccionar con un resto farmacológico o un nucleófilo conector.

Los grupos nucleófilos a modo de ejemplo en un resto farmacológico incluyen, amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para
 15 formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos conectores y reactivos conectores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Los reactivos de reticulado a modo de ejemplo que pueden usarse para preparar ADC se describen en el presente documento en la sección titulada "Conectores Ejemplares". Los métodos para usar tales reactivos de reticulado para
 20 conectar dos restos, incluyendo un resto proteico y un resto químico, se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico pueden fabricarse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican las porciones de anticuerpo y citotóxicas del conjugado bien adyacentes entre sí o separadas
 25 por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, un anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-marcaje del tumor cuando el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la
 30 retirada de compuesto sin conjugar de la circulación usando un agente de aclarado y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un fármaco o un radionucleótido).

E. Métodos y composiciones para diagnósticos y detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de CD79b en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca detección cuantitativa o cualitativa. Una "muestra biológica" comprende, por ejemplo, una célula o
 35 tejido (por ejemplo, un material de biopsia, incluyendo tejido linfático canceroso o potencialmente canceroso, incluyendo tejido de sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno de linfocitos b y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B, incluyendo, linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo
 40 reincidido, NHL reincidido indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar 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
 45 como se describe en el presente documento en 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 muestra biológica. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-CD79b para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-CD79b, por ejemplo donde CD79b es un biomarcador para la
 50 selección de pacientes. En una realización adicional, la muestra biológica es una célula o tejido (por ejemplo, tejido linfático canceroso o potencialmente canceroso, incluyendo tejido de sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno de linfocitos b y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B, incluyendo, linfoma, linfoma no hodkiniano
 55 (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo reincidido, NHL reincidido indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto.

En una realización adicional, se usa un anticuerpo anti-CD79b *in vivo* para detectar, por ejemplo, por formación de imágenes *in vivo*, un cáncer positivo a CD79b en un sujeto, por ejemplo, para los fines de diagnosticar, pronosticar o clasificar por etapas el cáncer, determinar el transcurso apropiado de la terapia o monitorizar la respuesta de un
 60 cáncer a terapia. Un método conocido en la técnica para la detección *in vivo* es la tomografía de emisión de inmunopositrones (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007) y Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003). En tales realizaciones, se proporciona un método para detectar un cáncer positivo a CD79b en un sujeto, comprendiendo el método administrar un anticuerpo anti-
 65

CD79b marcado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer positivo a CD79b y detectar el anticuerpo anti-CD79b marcado en el sujeto, en el que la detección del anticuerpo anti-CD79b marcado indica un cáncer positivo a CD79b en el sujeto. En ciertas de tales realizaciones, el anticuerpo anti-CD79b marcado comprende un anticuerpo anti-CD79b conjugado a un emisor de positrones, tal como ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr y ^{124}I . En una realización particular, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

Un método de diagnóstico o detección puede comprender poner en contacto un primer anticuerpo anti-CD79b inmovilizado en un sustrato con una muestra biológica a ensayarse para la presencia de CD79b, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti-CD79b y detectar si el segundo anti-CD79b se une a un complejo entre el primer anticuerpo anti-CD79b y CD79b en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio de soporte, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, diapositivas, chips y otros sustratos. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido (por ejemplo, un material de biopsia, incluyendo tejido linfático canceroso o potencialmente canceroso, incluyendo tejido de sujetos que tienen o se sospecha que tienen un trastorno de linfocitos b y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B, incluyendo, pero no se limitan a, linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recurrente, NHL recurrente indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto. En ciertas realizaciones, el primer o el segundo anticuerpo anti-CD79b es cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Los trastornos a modo de ejemplo que pueden diagnosticarse o detectarse de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen cánceres positivo a CD79bs, tales como linfoma positivo a CD79b, linfoma no hodkiniano positivo a CD79b (NHL; incluyendo, NHL agresivo positivo a CD79b, NHL agresivo recurrente positivo a CD79b, NHL indolente recurrente positivo a CD79b, NHL refractario positivo a CD79b y NHL indolente refractario positivo a CD79b), leucemia linfocítica crónica (CLL) CD79b positiva, linfoma linfocítico pequeño positivo a CD79b, leucemia CD79b positiva, leucemia de células pilosas (HCL) CD79b positiva, leucemia linfocítica aguda (ALL) CD79b positiva, linfoma de Burkitt positivo a CD79b y linfoma de células del manto positivo a CD79b. En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b es un cáncer que recibe una puntuación inmunohistoquímica (IHC) anti-CD79b mayor de "0", que corresponde a tinción muy débil o sin tinción en >90 % de las células tumorales. En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b expresa CD79b a un nivel 1+, 2+ o 3+, en el que 1+ corresponde a tinción débil en >50 % de las células neoplásicas, 2+ corresponde a tinción moderada en >50 % de las células neoplásicas y 3+ corresponde a tinción fuerte en >50 % de las células neoplásicas. En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b es un cáncer que expresa CD79b de acuerdo con un ensayo de hibridación *in situ* (ISH). En algunas de dichas realizaciones, se usa un sistema de clasificación similar a aquel usado para IHC. En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b es un cáncer que expresa CD79b de acuerdo con un ensayo de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta el ARNm de CD79b. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa.

Se proporcionan anticuerpos anti-CD79b marcados. Las marcas incluyen, marcas o restos que se detectan directamente (tales como marcas fluorescentes, de cromóforos, densas a electrones, quimioluminiscentes y radiactivas), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las marcas a modo de ejemplo incluyen, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , 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 EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcas de espín, marcas de bacteriófagos, radicales libres estables y similares. En otra realización, una marca es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen pero no se limitan a ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr y ^{124}I . En una realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr .

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado como se describe en el presente documento se preparan mezclando tal anticuerpo o inmunoconjugado que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos a los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina;

monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tal como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP a modo de ejemplo y los métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de EE.UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo o inmunoconjugado liofilizados a modo de ejemplo se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo o inmunoconjugado incluyen aquellas descritas en la Patente de EE.UU. n.º 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento puede contener también más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular a tratarse, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí.

Los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o el inmunoconjugado, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo películas, o microcápsulas.

Las formulaciones a usarse para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos terapéuticos y composiciones

Cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento pueden usarse en métodos, por ejemplo, métodos terapéuticos.

En un aspecto, Un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado proporcionado en el presente documento se usa en un método para inhibir la proliferación de una célula CD79b positiva, comprendiendo el método exponer la célula al anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado a CD79b en la superficie de la célula, inhibiendo por lo tanto la proliferación en la célula. En ciertas realizaciones, el método es un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula es una célula B. En algunas realizaciones, la célula es una célula B neoplásica, tal como una célula de linfoma o una célula de leucemia.

La inhibición de la proliferación celular *in vitro* puede ensayarse usando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo[™], que está disponible en el mercado de Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Véase Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, Patente de EE.UU. n.º 6602677. La prueba puede realizarse en formato de 96 o 384 placas, haciéndolo susceptible a detección de alto rendimiento automatizado (HTS). Véase Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento de prueba implica añadir un reactivo único (Reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas. Esto resulta en la lisis celular y la generación de una señal luminiscente producida por una reacción de la luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en cultivo. Los datos pueden grabarse por luminómetro o dispositivo de formación de imágenes de cámara CCD. La salida luminescente se expresa como unidades de luz relativas (RLU).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado para su uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de un cáncer positivo a CD79b. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado. En una realización de este tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

- En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado en la fabricación o la preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer positivo a CD79b. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar
- 5 cáncer positivo a CD79b, comprendiendo el método administrar a un individuo que tiene cáncer positivo a CD79b una cantidad eficaz del tratamiento. En una realización de este tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.
- 10 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar un cáncer positivo a CD79b. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene tal cáncer positivo a CD79b una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado. En una realización de este tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación.
- 15 Un cáncer positivo a CD79b de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser, por ejemplo, linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recaído, NHL recaído indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del
- 20 manto). En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b es un cáncer que recibe una puntuación anti-CD79b de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH) mayor que "0", que corresponde a tinción muy débil o sin tinción en >90 % de las células tumorales. En otra realización, un cáncer positivo a CD79b expresa CD79b a un nivel 1+, 2+ o 3+, en el que 1+ corresponde a tinción débil en >50 % de las células neoplásicas, 2+ corresponde a tinción moderada en >50 % de las células neoplásicas y 3+ corresponde a tinción fuerte en >50 % de las células
- 25 neoplásicas. En algunas realizaciones, un cáncer positivo a CD79b es un cáncer que expresa CD79b de acuerdo con un ensayo de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta el ARNm de CD79b. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa.
- En algunas realizaciones, los inmunoconjugados que comprenden un derivado de nemorubicina unido covalentemente al anticuerpo anti-CD79b a través de un conector escindible por proteasa son particularmente útiles para tratar linfomas de linfocitos B difusos, linfomas de células del manto y linfoma de Burkitt como se evidencia, por
- 30 ejemplo, por los modelos de xenoinjerto mostrados en los Ejemplos B, C, D, E y G. El inmunoconjugado para su uso en el tratamiento de linfomas de linfocitos B de células difusas, linfomas de células del manto y/o linfoma de Burkitt, puede, en algunas realizaciones, comprender PNU-159682. En algunas de dichas realizaciones, el inmunoconjugado comprende PNU-159682 y un conector que comprende val-cit, tal como el inmunoconjugado
- 35 mostrado en la Figura 5B.
- En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b, en el que el cáncer positivo a CD79b es resistente a un primer agente terapéutico. En algunas realizaciones, el
- 40 cáncer positivo a CD79b que es resistente a un primer agente terapéutico expresa la glucoproteína P (P-gp). En algunas realizaciones, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recaído, NHL recaído indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células
- 45 del manto. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico comprende un primer anticuerpo que se une a un antígeno distinto del CD79b y un primer agente citotóxico. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico es un primer inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo que se une a un antígeno distinto del CD79b y un primer agente citotóxico. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une a CD22. En algunas realizaciones, el primer agente citotóxico y el agente citotóxico del inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b son diferentes. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico se selecciona de MMAE, una calicheamicina, un maitansinoide y una pirrolobenzodiazepina. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico es MMAE y el agente citotóxico del inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b es un derivado de nemorubicina. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico es una
- 50 pirrolobenzodiazepina y el agente citotóxico del inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b es un derivado de nemorubicina. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico es un maitansinoide y el agente citotóxico del inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une a CD79b es un derivado de nemorubicina.
- 60 En algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une a CD79b. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico se selecciona de MMAE, una calicheamicina, un maitansinoide y una pirrolobenzodiazepina y el agente citotóxico del inmunoconjugado descrito en el presente documento es un derivado de nemorubicina. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico es MMAE y el agente citotóxico del inmunoconjugado descrito en el presente documento es un derivado de nemorubicina. En algunas de dichas realizaciones, el primer
- 65 agente citotóxico es una pirrolobenzodiazepina y el agente citotóxico del inmunoconjugado descrito en el presente documento es un derivado de nemorubicina. En algunas de dichas realizaciones, el primer agente citotóxico es un

maitansinoide y el agente citotóxico del inmunoconjugado descrito en el presente documento es un derivado de nemorubicina.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b / P-gp positivo. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un
 10 inmunoconjugado descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer positivo a CD79b / P-gp positivo se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivado, NHL recidivado indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma
 15 de células del manto. En algunas realizaciones, un cáncer se considera ser un P-gp positivo cuando el cáncer expresa mayores niveles de ARNm y/o de proteína de P-gp que las células o el tejido control. Las células o el tejido control pueden, en diversas realizaciones, ser células o tejido no cancerosos del mismo paciente; células o tejido no cancerosos o cancerosos de un paciente diferente o de un individuo sano o de un conjunto de pacientes o individuos sanos; células o tejido no cancerosos o cancerosos del mismo paciente tomados en un punto en el tiempo anterior, tales como, por ejemplo, antes de un régimen de tratamiento inicial; o de individuos sanos; etc.

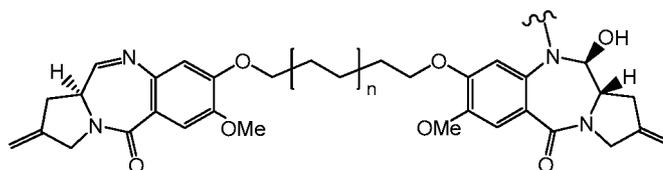
20 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar a un individuo con cáncer, en los que el cáncer es resistente a un primer agente terapéutico. En algunas realizaciones, el primer agente terapéutico es un primer inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo conectado a un primer agente citotóxico a través de un primer conector. En algunas realizaciones, un método para tratar a un individuo con un cáncer que es resistente a un primer agente terapéutico (tal como un primer inmunoconjugado) comprende administrar un segundo
 25 inmunoconjugado que comprende un segundo anticuerpo conectado a un segundo agente citotóxico a través de un segundo conector. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes antígenos y el primer agente citotóxico y el segundo agente citotóxico son el mismo o diferentes. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes antígenos que están presentes en al menos alguna de las mismas células. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes antígenos y el primer agente citotóxico y el segundo agente citotóxico son diferentes. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a los mismos antígenos y el primer agente citotóxico y el segundo agente citotóxico son diferentes. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el primer conector y el segundo conector pueden ser el mismo o diferentes. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes antígenos, el primer y el segundo conectores son diferentes y el primer y el segundo agentes citotóxicos son diferentes.

35 Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un humano.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugado proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugado proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugado proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

45 Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse bien solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo b o inmunoconjugado de la invención puede co-administrarse con al menos un agente terapéutico adicional.

50 En algunas realizaciones, se administra un inmunoconjugado anti-CD79b en combinación con un anticuerpo o inmunoconjugado anti-CD22. Un anticuerpo o inmunoconjugado anti-CD22 a modo de ejemplo comprende las regiones hipervariables de 10F4v3, de tal manera que el anticuerpo o inmunoconjugado anti-CD22 comprende (i) HVR H1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 42, (ii) HVR H2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 43, (iii) HVR H3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 44, (iv) HVR L1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 45, (v) HVR L2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 46 y (vi) HVR L3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 47. En algunas realizaciones, un anticuerpo o inmunoconjugado anti-CD22 comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de 10F4v3. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo o inmunoconjugado anti-CD22 comprende la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 48 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 49. Un inmunoconjugado anti-CD22 comprende, en algunas realizaciones, un agente citotóxico seleccionado de una auristatina, un derivado de nemorubicina y una pirrolobenzodiazepina. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado anti-CD22 comprende un agente citotóxico seleccionado de MMAE, PNU-159682 y un dímero PBD que tiene la estructura:



;

en la que la línea ondulada indica la fijación a un conector, que está fijado al anticuerpo anti-CD79b y en la que n es 0 o 1. Los conectores a modo de ejemplo que pueden usarse en los inmunoconjugados anti-CD79b incluyen aquellos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado anti-CD22 se selecciona de un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC A118C-MC-val-cit-PAB-MMAE, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC S400C-MC-val-cit-PAB-MMAE y un inmunoconjugado Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC V205C-MC-val-cit-PAB-MMAE, que se describen, por ejemplo, en el documento US 2008/0050310; un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC A118C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC A118C-MC-acetal-PNU-159682, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC A118C-MC-val-cit-PAB-PBD, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC S400C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC S400C-MC-acetal-PNU-159682, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC S400C-MC-val-cit-PAB-PBD, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC V205C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682, un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC V205C-MC-acetal-PNU-159682 y un Tio Hu anti-CD22 10F4v3 LC V205C-MC-val-cit-PAB-PBD. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera para Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC A118C se muestran en SEQ ID NO: 50 y 51, respectivamente. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera para Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC S400C se muestran en SEQ ID NO: 52 y 51, respectivamente. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera para Tio Hu anti-CD22 10F4v3 HC V205C se muestran en SEQ ID NO: 56 y 53, respectivamente. Aparte de la secuencia de anticuerpo específica, las estructuras de los inmunoconjugados anti-CD22 son análogas a las estructuras de los inmunoconjugados anti-CD79b descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, se administra un inmunoconjugado anti-CD22 en combinación con un anticuerpo anti-CD20 (bien un anticuerpo desnudo o un ADC). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab (Rituxan[®]) o 2H7 (Genentech, Inc., Sur San Francisco, CA). En algunas realizaciones, un inmunoconjugado anti-CD22 se administra en combinación con un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab, nombre comercial Avastin[®]).

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un inmunoconjugado anti-CD22, incluyendo, terapia de radiación y/o trasplantes de médula ósea y sangre periférica y/o un agente citotóxico. En algunas realizaciones, un agente citotóxico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin[™]), prednisolona, CHOP (combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona), CVP (combinación de ciclofosfamida, vincristina y prednisolona) o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, rituximab, nombre comercial Rituxan[®]), anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab, nombre comercial Avastin[®]), taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y antibióticos de antraciclina.

Tales terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma o en formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir antes de, simultáneamente y/o después, de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención también pueden usarse en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para administración local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Diversos horarios de dosificación que incluyen pero no se limitan a administraciones únicas o múltiples durante la administración de bolos diversos puntos de tiempo y la infusión de pulso se contemplan en el presente documento.

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una forma coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular a tratarse, el mamífero particular a tratarse, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de transporte del agente, el método de administración, el horario de administración y otros factores conocidos por los médicos facultativos. El anticuerpo o inmunoconjugado no necesita, pero puede formularse opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales agentes distintos depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo del trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en el presente documento, o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en

cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente ser apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo o inmunoc conjugado de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, el tipo de anticuerpo o inmunoc conjugado, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoc conjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoc conjugado y la discreción del médico que atiende. El anticuerpo o inmunoc conjugado se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante 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-10 mg/kg) de anticuerpo o inmunoc conjugado puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de 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 afección, el tratamiento generalmente se mantendría sostenido hasta que se diera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo o el inmunoc conjugado estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, 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 los mismos) puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y pruebas convencionales.

En algunas realizaciones, puede usarse una dosis menor de un ADC huMA79b (tal como huMA79bv28) que comprende un derivado de nemorubicina, tal como PNU-159682, para lograr la misma eficiencia que una dosis mayor de un huMA79b ADC que comprende un resto MMAE.

Se entiende que cualquiera de las anteriores formulaciones o métodos terapéuticos puede llevarse a cabo usando tanto un inmunoc conjugado de la invención como un anticuerpo anti-CD79b.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es ella misma o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico del trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoc conjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo o inmunoc conjugado de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otra manera terapéutico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

III. Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención.

A. Producción de conjugados de fármaco anticuerpo anti-CD79b

El anticuerpo MA79b anti-CD79b y ciertas variantes, incluyendo el injerto huMA79b humanizado y las variantes humanizadas huMA79bv17, huMA79bv18, huMA79bv28 y huMA79bv32, se describen, por ejemplo, en el documento US 8.088.378 B2. La Tabla 2 muestra las SEQ ID NO que corresponden a la cadena pesada, la cadena ligera y las regiones hipervariables (HVR) para cada anticuerpo.

Tabla 2: Secuencias que corresponden a MA79b y variantes humanizadas

Anticuerpo	Región variable HC SEQ ID NO:	Región variable LC SEQ ID NO:	HVR H1 SEQ ID NO:	HVR H2 SEQ ID NO:	HVR H3 SEQ ID NO:	HVR L1 SEQ ID NO:	HVR L2 SEQ ID NO:	HVR L3 SEQ ID NO:
MA79b	3	4	15	16	17	18	19	20
injerto huMA79b	5	6	15	16	17	18	19	20
huMA79bv17	7	8	15	16	17	18	19	20
huMA79bv18	9	10	15	16	23	18	19	20
huMA79bv28	11	12	21 (idéntico a 15)	22 (idéntico a 16)	23	24	25 (idéntico a 19)	26 (idéntico a 20)
huMA79bv32	13	14	15	16	23	35	19	20

5 Las regiones marco de cadena pesada para los anticuerpos huMA79bv17, huMA79bv18, huMA79bv28 y huMA79bv32, HC FR1 a FR4, se muestran en las SEQ ID NO: 27 a 30, respectivamente. Las regiones marco de cadena ligera para los anticuerpos huMA79bv17, huMA79bv18 y huMA79bv28, LC FR1 a FR4, se muestran en las SEQ ID NO: 31 a 34, respectivamente. Las regiones marco de cadena ligera para los anticuerpos huMA79bv32, LC FR1 a FR4, se muestran en las SEQ ID NO: 31, 36, 33 y 34, respectivamente. La afinidad de unión de huMA79b se descubrió ser aproximadamente 0,4 nM usando análisis Scatchard. Véase, por ejemplo, el documento US 8.088.378 B2.

10 Para una producción de anticuerpos a escala mayor, los anticuerpos se produjeron en células CHO. Los vectores que codifican para VL y VH se transfectaron en células CHO y se purificó IgG del medio de cultivo celular por cromatografía de afinidad de proteína A.

15 Los conjugados anticuerpo fármaco (ADC) anti-CD79b se produjeron conjugando anticuerpos Tio huMA79bv28 HC A118C a ciertos restos farmacológicos. Tio huMA79bv28 HC A118C es un anticuerpo huMA79bv28 con una mutación A118C en la cadena pesada que añade un grupo tiol conjugable. Véase, por ejemplo, el documento US 8.088.378 B2. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Tio huMA79bv28 HC A118C se muestra en SEQ ID NO: 39 (véase la Figura 4) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Tio huMA79bv28 HC A118C se muestra en SEQ ID NO: 37) (véase la Figura 3). Los inmunoconjugados se prepararon como sigue.

20 Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-acetal-PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-2")

25 Antes de la conjugación, el anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT) para retirar grupos bloqueantes (por ejemplo cisteína) de las cisteínas diseñadas por ingeniería del tio-anticuerpo. Este proceso también reduce los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo. El anticuerpo reducido se purificó para retirar los grupos bloqueantes liberados y los disulfuros intercatenarios se reoxidaron usando ácido deshidro-ascórbico (dhAA). El anticuerpo intacto se combinó después con el resto fármaco-conector MC-acetal-PNU-159682 para permitir la conjugación del resto fármaco-conector a los restos cisteína diseñados por ingeniería del anticuerpo. La reacción de conjugación se inactivó añadiendo N-acetilcisteína en exceso para reaccionar con cualquier resto conector-fármaco libre y se purificó el ADC. La carga de fármaco (número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo) para el ADC fue aproximadamente 1,86, como se indica en los Ejemplos a continuación. HuMA79bv28-PNU-2 tiene la estructura mostrada en la Figura 5A (p = carga de fármaco).

35 Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1")

40 Antes de la conjugación, el anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT) para retirar grupos bloqueantes (por ejemplo cisteína) de las cisteínas diseñadas por ingeniería del tio-anticuerpo. Este proceso también reduce los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo. El anticuerpo reducido se purificó para retirar los grupos bloqueantes liberados y los disulfuros intercatenarios se reoxidaron usando ácido deshidro-ascórbico (dhAA). El anticuerpo intacto se combinó después con el resto fármaco-conector MC-val-cit-PAB-PNU-159682 ("val-cit" también puede denominarse en el presente documento "vc") para permitir la conjugación del resto fármaco-conector a los restos cisteína diseñados por ingeniería del anticuerpo. La reacción de conjugación se inactivó añadiendo N-acetilcisteína en exceso para reaccionar con cualquier resto conector-fármaco libre y se purificó el ADC. La carga de fármaco (número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo) para el ADC estuvo en el intervalo de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 1,9, como se indica en el Ejemplo a continuación. HuMA79bv28-PNU-1 tiene la estructura mostrada en la Figura 5B (p = carga de fármaco).

50 Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PAB-MMAE ("huMA79bv28-MMAE")

Antes de la conjugación, el anticuerpo se redujo con ditioneitol (DTT) para retirar grupos bloqueantes (por ejemplo cisteína) de las cisteínas diseñadas por ingeniería del tio-anticuerpo. Este proceso también reduce los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo. El anticuerpo reducido se purificó para retirar los grupos bloqueantes liberados y los disulfuros intercatenarios se reoxidaron usando ácido deshidro-ascórbico (dhAA). El anticuerpo intacto se combinó después con el resto fármaco-conector MC-val-cit-PAB-MMAE ("val-cit" también puede

denominarse en el presente documento "vc") para permitir la conjugación del resto fármaco-conector a los restos cisteína diseñados por ingeniería del anticuerpo. La reacción de conjugación se inactivó añadiendo N-acetilcisteína en exceso para reaccionar con cualquier resto conector-fármaco libre y se purificó el ADC. La carga de fármaco (número promedio de restos farmacológicos por anticuerpo) para el ADC se determinó ser aproximadamente 2, como se indica en los ejemplos a continuación. Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PAB-MMAE se describe, por ejemplo, en el documento US 8.088.378 B2.

B. Actividad anti-tumoral *in vivo* de conjugados fármaco anticuerpo anti-CD79b humanizado en un modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2

Para ensayar la efectividad de los conjugados Tio huMA79bv28 HC A118C con pnu-159682 ("huMA79bv28-PNU-1" y "huMA79bv28-PNU-2"), se examinaron los efectos de los anticuerpos conjugados en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores WSU-DLCL2 (línea celular de linfoma de linfocitos B grandes difusos).

Ratones hembra CB17 ICR SCID (11-12 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células WSU-DLCL2 (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-250 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro J, et al. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. 2009; paquete R, versión 3,1-96). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log2 del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

Se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 2 mg ADC/kg de inmunocóncugado Tio huMA79bv28 HC A118C o conjugados anticuerpo-fármaco control (ADC control). Los ADC control se unen a una proteína que no se expresa en la superficie de las células WSU-DLCL2. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanizaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 3 y la Figura 6. La Tabla 3 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

Tabla 3: Administración de ADC anti-CD79b a ratones con xenoinjertos WSU-DLCL2

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco (µg/kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-PNU-1	8/8	2	0	15,66	2	1,83
ADC-A118C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682 Control ("Control-PNU-1")	8/8	0	0	15,83	2	1,85
huMA79bv28-PNU-2	3/8	0	0	15,91	2	1,86
ADC-A118C-MC-acetal-PAB-PNU-159682 Control ("Control-PNU-2")	8/8	0	0	16,25	2	1,9
Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-vc-PAB-MMAE ("huMA79bv28-MMAE")	8/8	0	0	19,24	2	2,01

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

En un transcurso de tiempo de 35 días con conjugados de fármacos y dosis como se muestra en la Tabla 3, los ADC tio huMA79bv28 conjugados a través de un conector escindible por proteasa con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1") mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores WSU-DLCL2 en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-1"). Véase la Figura 6. Los tio huMA79bv28 conjugados a través de un conector lábil al ácido con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-2") también mostraron inhibición del crecimiento

tumoral en ratones SCID con tumores WSU-DLCL2 en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-2").

Además, cuando se administra a 2 mg/kg, huMA79bv28-PNU-1 inhibió mejor el crecimiento tumoral que huMA79bv28 conjugado con el fármaco MMAE auristatina ("huMA79bv28-MMAE"). Véase la Figura 6.

En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de los ADC huMA79bv28 no provocó una disminución significativa en el peso corporal durante el estudio.

C. Actividad anti-tumoral *in vivo* de conjugados fármaco anticuerpo anti-CD79b humanizado en un modelo de xenoinjerto Granta-519

Para ensayar la efectividad de los conjugados Tio huMA79bv28 HC A118C con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1" y "huMA79bv28-PNU-2"), se examinaron los efectos de los anticuerpos conjugados en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores Granta-519 (línea celular de linfoma de células del manto humano).

Ratones hembra CB17 ICR SCID (10-11 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células Granta-519 (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-250 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro et al. 2009). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log2 del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

Se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 1 mg ADC/kg de inmunoc conjugado huMA79bv28 o conjugados anticuerpo-fármaco control (ADC control). Los ADC control se unen a una proteína que no se expresa en la superficie de las células Grant-519. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanizaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 4 y la Figura 7. La Tabla 4 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

Tabla 4: Administración de ADC anti-CD79b a ratones con xenoinjertos Grant-519

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco-(µg//kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-PNU-1	4/8	4	4	7,83	1	1,83
Control-PNU-1	8/8	1	0	7,91	1	1,85
huMA79bv28-PNU-2	8/8	2	0	7,96	1	1,86
Control-PNU-2	8/8	0	0	8,13	1	1,9
huMA79bv28-MMAE	6/8	1	2	9,62	1	2,01

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

En un transcurso de tiempo de 31 días con los ADC y dosis mostrados en la Tabla 4, el tio huMA79bv28 conjugado a través de un conector escindible por proteasa con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1") mostró la inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores Granta-519 en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-1"). Véase la Figura 7. El tio huMA79bv28 conjugado a través de un conector lábil al ácido con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-2") también mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores Granta-519 en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-2"). Cuando se da a 1 mg/kg,

huMA79bv28-PNU-1 muestra inhibición del crecimiento tumoral ligeramente más eficaz que el tiomAb anti-CD79b humanizado conjugado con el fármaco de auristatina MMAE ("huMA79bv28-MMAE").

5 Cuatro ratones que recibieron 1 mg/kg de huMA79bv28-PNU-1 mostraron respuesta completa, mientras que solamente dos ratones que recibieron 1 mg/kg de huMA79bv28-MMAE mostraron respuesta completa. Véase la tabla 4.

10 En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de los ADC huMA79bv28 no provocó una disminución significativa en el peso corporal durante el estudio.

D. Actividad anti-tumoral *in vivo* de conjugados fármaco anticuerpo anti-CD79b humanizado en un modelo de xenoinjerto SuDHL4

15 Para ensayar la efectividad de los conjugados Tio huMA79bv28 HC A118C con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1" y "huMA79bv28-PNU-2"), se examinaron los efectos de los anticuerpos conjugados en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores SuDHL4 (línea celular de linfoma de linfocitos B grandes difusos).

20 Ratones hembra CB17 ICR SCID (10-11 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células SuDHL4-luc (obtenidas de DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania, y se diseñaron por ingeniería en Genentech para expresar establemente un gen de luciferasa). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-250 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro et al. 2008). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log2 del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

35 Grupos de 7 ratones se trataron con una única dosis intravenosa (i.v.) de 1 mg ADC/kg de inmunoc conjugado huMA79bv28 o conjugados anticuerpo-fármaco control (ADC control). Los ADC control se unen a una proteína que no se expresa en la superficie de las células SuDHL4-luc. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanizaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

40 Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 5 y la Figura 8. La Tabla 5 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

Tabla 5: Administración de ADC anti-CD79b a ratones con xenoinjertos SuDHL4-luc

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco (µg/kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	7/7	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-PNU-1	7/7	2	0	7,83	1	1,83
Control-PNU-1	7/7	0	0	7,91	1	1,85
huMA79bv28-PNU-2	7/7	1	0	7,96	1	1,86
Control-PNU-2	7/7	0	0	8,13	1	1,9
huMA79bv28-MMAE	5/7	1	3	9,62	1	2,01
Control-ADC-A118C-MC-vc-PAB-MMAE ("Control MMAE")	7/7	0	0	10,05	1	2,1

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

50 En un transcurso de tiempo de 21 días con conjugados de fármacos y dosis como se muestra en la Tabla 5, el ADC tio Hu anti-CD79b conjugado a través de un conector escindible por proteasa con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-

1") mostró la inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores SuDHL4-luc en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-1"). Véase la Figura 8. El tio huMA79bv28 conjugado a través de un conector lábil al ácido con PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-2") también mostró la inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores SuDHL4-luc en comparación con el vehículo y el ADC control ("Control-PNU-2").

5 Adicionalmente, 1 mg/kg de huMA79bv28-PNU-1 mostró actividad anti-tumoral comparable al tiomab anti-CD79b humanizado conjugado con el fármaco MMAE auristatina ("huMA79bv28-MMAE").

10 En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de los ADC huMA79bv28 no provocó una disminución significativa en el peso corporal durante el estudio.

E. Estudio de escala de dosis de huMA79bv28-PNU-1 en un modelo de xenoinjerto de SuDHL4-luc

15 Se examinó la eficiencia de huMA79bv28-PNU-1 en diversos niveles de dosificación en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores SuDHL4-luc (línea celular de linfoma de linfocitos B grandes difusos).

20 Ratones hembra CB17 ICR SCID (10-11 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células SuDHL4-luc (obtenidas de DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania, y se diseñaron por ingeniería en Genentech para expresar establemente un gen de luciferasa). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-300 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro et al. 2008). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log2 del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

30 Se trataron grupos de 7 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 0,2, 0,5, 1 o 2 mg de ADC/kg de huMA79bv28-PNU-1 o Control-PNU-1, que se une a una proteína que no se expresa en la superficie de las células SuDHL4-luc. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanizaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

40 Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 6 y la Figura 9. La Tabla 7 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

45

Tabla 6: Administración de ADC anti-CD79b a ratones con xenoinjertos SuDHL4-luc

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco (µg/kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	7/7	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-PNU-1	7/7	1	0	1,63	0,2	1,9
huMA79bv28-PNU-1	7/7	1	0	4,06	0,5	1,9
huMA79bv28-PNU-1	6/7	1	1	8,13	1	1,9
huMA79bv28-PNU-1	4/7	4	3	16,25	2	1,9
Control-PNU-1	7/7	0	0	7,91	1	1,85
Control-PNU-1	7/7	0	0	15,83	2	1,85

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

50 En un transcurso de tiempo de 49 días con conjugados de fármacos y dosis como se muestra en la Tabla 6, huMA79bv28-PNU-1 mostró inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores SuDHL4-luc. Cuando se administra a 0,2 mg/kg o dosis mayor, huMA79bv28-PNU-1 mostró clara actividad inhibitoria en comparación con el vehículo o el ADC control. Véase la Figura 9. A 2 mg/kg, tres ratones

administrados con huMA79bv28-PNU-1 mostraron una respuesta completa y cuatro ratones mostraron una respuesta parcial. Véase la tabla 6.

5 En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de huMA79bv28-PNU-1 no provocó una disminución significativa en el peso corporal durante el estudio. Sin relación con el tratamiento, un ratón al que se dio 1 mg/kg de huMA79bv28-PNU-1 se volvió anoréxico y se eutanizó antes de que la pérdida de peso corporal alcanzara el 15 %.

F. Estudio de escala de dosis de huMA79bv28-PNU-1 en un modelo de xenoinjerto de BJAB-luc

10 Se examinó la eficiencia de huMA79bv28-PNU-1 en diversos niveles de dosificación en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores BJAB-luc (línea celular de linfoma de Burkitt).

15 Ratones hembra CB17 ICR SCID (12-13 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células BJAB-luc (disponibles, por ejemplo, de Lonza, Basel, Suiza, y se diseñó por ingeniería en Genentech para expresar establemente un gen de luciferasa). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-300 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro et al. 2008). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log₂ del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

20 Se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 0,2, 0,5, 1 o 2 mg de ADC/kg de huMA79bv28-PNU-1 o Control-PNU-1, que se une a una proteína que no se expresa en la superficie de las células BJAB-luc. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanizaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

30 Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 7 y la Figura 10. La Tabla 8 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

Tabla 7: Administración de ADC anti-CD79b a ratones con xenoinjertos BJAB-luc

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco (µg//kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-PNU-1	8/8	1	0	1,63	0,2	1,9
huMA79bv28-PNU-1	7/8	2	1	4,06	0,5	1,9
huMA79bv28-PNU-1	0/8	0	8	8,13	1	1,9
huMA79bv28-PNU-1	0/8	0	8	16,25	2	1,9
Control-PNU-1	8/8	0	0	7,91	1	1,85
Control-PNU-1	8/8	0	0	15,83	2	1,85

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

45 En un transcurso de tiempo de 41 días con conjugados de fármacos y dosis como se muestra en la Tabla 8, huMA79bv28-PNU-1 mostró inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores BJAB-luc. Cuando se administra a 0,2 mg/kg o dosis mayor, huMA79bv28-PNU-1 mostró clara actividad inhibitoria en comparación con el vehículo o el ADC control. Véase la Figura 10. Además, una única dosis de 1 o 2 mg/kg de huMA79bv28-PNU-1 resultó en la remisión completa del tumor en todos los animales tratados.

50 En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de huMA79bv28-PNU-1 no provocó una disminución significativa en el

peso corporal durante el estudio.

G. Estudio de escala de dosis de huMA79bv28-MMAE en un modelo de xenoinjerto de BJAB-luc

- 5 Se examinó la eficiencia de huMA79bv28-MMAE en diversos niveles de dosificación en un modelo de xenoinjerto de ratón de tumores BJAB-luc (línea celular de linfoma de Burkitt).

10 Ratonas hembra CB17 ICR SCID (13-14 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada una subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células BJAB-luc (disponibles, por ejemplo, de Lonza, Basel, Suiza, y se diseñó por ingeniería en Genentech para expresar establemente un gen de luciferasa). Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 150-300 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro et al. 2008). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log₂ del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

20 Se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 0,1, 0,5, 1, 2, o 4 mg de ADC/kg de huMA79bv28-MMAE, huMA79bv28 sin conjugar o Control-MMAE, que se une a una proteína que no se expresa en la superficie de las células BJAB-luc. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanzaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos animales están aprobados por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

30 Los resultados de ese experimento se muestran en la Tabla 8 y la Figura 11. La Tabla 10 muestra cada grupo de tratamiento, el número de ratones con tumores observables al final del estudio ("TI"), el número de ratones que muestra una respuesta parcial ("PR"; donde el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración cayó por debajo del 50 % del volumen del tumor medido el día 0), el número de ratones que muestran una respuesta completa ("CR"; donde el volumen del tumor en cualquier tiempo después de la administración cayó a 0 mm³), la dosis de fármaco para cada grupo, la dosis de anticuerpo para cada grupo y la carga de fármaco para cada ADC administrado.

35

Tabla 8: Administración de ADC anti-CD79a a ratones con xenoinjertos BJAB-luc

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	TI	PR	CR	Dosis de fármaco (µg/kg)	Dosis de Ac (mg/kg)	Carga farmacológica (Fármaco/Ac)
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
huMA79bv28-MMAE	8/8	0	0	1,77	0,1	3,7
huMA79bv28-MMAE	8/8	0	0	8,86	0,5	3,7
huMA79bv28-MMAE	8/8	4	0	17,71	1	3,7
huMA79bv28-MMAE	1/8	1	7	35,42	2	3,7
huMA79bv28-MMAE	0/8	0	8	70,84	4	3,7
Control-MMAE	8/8	0	0	57,37	4	2,9
huMA79bv28	8/8	0	0	n/a	4	n/a

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, PS20 al 0,02 %; n/a = no aplicable.

40 En un transcurso de tiempo de 42 días con conjugados de fármacos y dosis como se muestra en la Tabla 10, huMA79bv28-MMAE mostró inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores BJAB-luc. En contraste a huMA79bv28-PNU-1, que mostró inhibición completa a 1 mg de ADC/kg y una inhibición muy fuerte a 0,5 mg ADC/kg (véase la Figura 10), huMA79bv28-MMAE no mostró inhibición completa hasta una dosis de 2 mg de ADC/kg.

45 En este estudio, el cambio del peso corporal en porcentaje se determinó en cada grupo de dosificación. Los resultados indicaron que la administración de huMA79bv28-MMAE no provocó una disminución significativa en el peso corporal durante el estudio.

H. Efectividad de Inmunoconjugados Anti-CD79b que comprenden un derivado de nemorubicina en células Bjab-luc resistentes a anti-CD79b-vc-MMAE

50

Para determinar la efectividad de un inmunoc conjugado anti-CD79b que comprende un derivado de nemorubicina en un linfoma no hodkiniano que había desarrollado resistencia a anti-CD79b-vc-MMAE, se desarrollaron *in vivo* células Bjab-luc que son resistentes a anti-CD79b-vc-MMAE.

- 5 Ratones CB17 SCID (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se inocularon subcutáneamente en el flanco dorsal derecho con 20 millones de células Bjab-luc en HBSS. Veinte ratones inoculados con células Bjab-luc se dosificaron con 1,5 mg/kg de huMA79bv28-MC-vc-PAB-MMAE intravenosamente el día 0. Para determinar cuándo se dosificaría de nuevo el ratón, y a qué dosis, se tomó lo siguiente en consideración: si re-crecieron o no los tumores después del tratamiento inicial /es decir, los tumores que volvieron a crecer al tamaño de volumen tumoral inicial el día 0) y la velocidad de recrecimiento. La frecuencia de dosis administradas varió con el tiempo pero no excedió 2 dosis/semana. Las dosis intravenosas no excedieron 300 µl. El intervalo de dosis administradas fue 1,5, 2, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 18, 20 y 30 mg/kg. La dosificación fue discontinua una vez que un tumor ya no respondía (es decir, mostró resistencia a) una serie de dosis en aumento.
- 10
- 15 Se generaron dos líneas resistentes, denominadas BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.1X1 y BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1. CD79b se expresó en la superficie de las células resistentes y los anticuerpos anti-CD79b se internalizaron por las células resistentes. La resistencia *in vivo* a tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PABPNU-159682 se confirmó en el modelo de xenoinjerto BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.1X1.
- 20 La expresión de la glucoproteína P (P-gp, también denominada proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos, o MDR1) en las células resistentes y las células Bjab-luc parentales se determinó por RT-PCR, FACS y resonancia de plasmón de superficie. Los tres métodos mostraron que P-gp estaba regulada positivamente en células BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.1X1 y BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1, en comparación con las células Bjab-luc parentales. La Figura 12 muestra la expresión de P-gp en las células resistentes como se determinó por FACS.
- 25

Para apoyar la hipótesis de que P-gp es al menos parcialmente responsable de la resistencia a huMA79bv28-MMAE observada en células BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.1X1 y BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1, se desarrollaron células Bjab-luc que expresaban P-gp de forma estable. La Figura 12 muestra la expresión de P-gp en dos líneas celulares Bjab-luc que expresan de forma estable (una línea celular de alta expresión y una línea celular de baja expresión). También se descubrió que las células Bjab-luc_P-gp eran resistentes a huMA79bv28-MMAE.

30

Para determinar si un inmunoc conjugado anti-CD79b que comprende un derivado de nemorubicina puede ser eficaz contra las células resistentes, se probó la efectividad de PNU-159682 en las líneas celulares Bjab-luc que expresan P-gp. Como se muestra en la Figura 13, aunque PNU-159682 es un análogo de la antraciclina, no parecía ser un sustrato para P-gp. Las células Bjab-luc de alta expresión de P-gp y las células Bjab-luc de baja expresión de P-gp fueron ambas sensibles a PNU-159682.

35

La efectividad de tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682 ("huMA79bv28-PNU-1") se determina en un modelo de xenoinjerto BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1. Ratones hembra CB17 ICR SCID (10 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) se inocularon cada uno subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 células BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1. Cuando los tumores de xenoinjerto alcanzaron un volumen tumoral promedio de 100-200 mm³ (haciendo referencia al Día 0), se administró la primera y única dosis de tratamiento. El volumen tumoral se calculó basándose en dos dimensiones, medidas usando calibres y se expresó en mm³ de acuerdo con la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, en la que a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Para analizar la medición repetida de volúmenes tumorales de los mismos animales durante el tiempo, se usó un enfoque de modelización mixto (véase, por ejemplo, Pinheiro J, et al. 2008). Este enfoque puede dirigir tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la retirada no relacionada con el tratamiento de los animales antes del final del estudio. Se usaron curvas de regresión cúbicas para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del log2 del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto.

40

45

50

Se trataron grupos de 8 ratones con una única dosis intravenosa (i.v.) de 1-2 mg ADC/kg de huMA79bv28-PNU-1 u 8-12 mg ADC/kg huMA79bv28-MC-vc-PAB-MMAE. Los pesos de tumores y corporales de los ratones se midieron 1-2 veces a la semana a lo largo del experimento. Los ratones se eutanzaron antes de que los volúmenes de los tumores alcanzaran 3000 mm³ o cuando los tumores mostraron signos de ulceración.

55

Se espera que las células BJAB.Luc_SN8v28-vcE(CD79b)_T1.2X1 sean resistentes a huMA79bv28-MC-vc-PAB-MMAE *in vivo*, pero son sensibles a huMA79bv28-PNU-1.

60

Tabla de secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia

ES 2 661 572 T3

1	secuencia de región variable humIII	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSV ISGDGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGF DYWGQGTLVT VSS
2	secuencia de región variable humk 1	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQSI NYLAWYQQKPK GKAPKLLIYA ASSLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSLPWTFGQ GTKVEIKR
3	región variable de cadena pesada MA79b	EVQLQQSGAE LMKPGASVKI SCKATGYTFS SYWIEWVKQR PGHGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRKATF TADTSSNTAY MQLSSLTSED SAVYYCTRRV PVYFDYWGQG TSVTVSS
4	región variable de cadena ligera MA79b	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSD YDGSDFLNWY QQKPGQPPKL FIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSNEDPL TFGAGTELEL KR
5	región variable de cadena pesada de injerto huMA79b	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWVGE ILPGGGDTNY NEIFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PVYFDYWGQG TLVTVSS
6	región variable de cadena ligera de injerto huMA79b	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSD YDGSDFLNWY QQKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
7	región variable de cadena pesada huMA79bv17	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PVYFDYWGQG TLVTVSS
8	región variable de cadena ligera huMA79bv17	DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSD YDGSDFLNWY QQKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
9	región variable de cadena pesada huMA79bv18	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PIRLDYWGQG TLVTVSS
10	región variable de cadena ligera huMA79bv18	DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSD YDGSDFLNWY QQKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
11	región variable de cadena pesada huMA79bv28	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PIRLDYWGQG TLVTVSS
12	región variable de cadena ligera huMA79bv28	DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSD YEGDSDFLNWY QQKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
13	región variable de cadena pesada huMA79bv32	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PIRLDYWGQG TLVTVSS
14	región variable de cadena ligera huMA79bv32	DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSD YSGDSDFLNWY QQKPGKAPKL FIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KR
15	MA79b HVR H1	GYTFSSYWIE
16	MA79b HVR H2	GEILPGGGDTNYNEIFKG
17	MA79b HVR H3	TRRVPVYFDY
18	MA79b HVR L1	KASQSDYDGDSDLN
19	MA79b HVR L2	AASNLES
20	MA79b HVR L3	QQSNEDPLT
21	huMA79bv28 HVR H1	GYTFSSYWIE

ES 2 661 572 T3

22	huMA79bv28 HVR H2	GEILPGGGDTNYNEIFKG
23	huMA79bv28 HVR H3	TRRVPIRLDY
24	huMA79bv28 HVR L1	KASQSVDYEGDSFLN
25	huMA79bv28 HVR L2	AASNLES
26	huMA79bv28 HVR L3	QQSNEDPLT
27	región marco (FR) 1 de cadena pesada (HC) huMA79bv28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
28	huMA79bv28 HC FR2	WVRQAPGKGLEWI
29	huMA79bv28 HC FR3	RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
30	huMA79bv28 HC FR4	WGQGTTLTVSS
31	FR1 de la cadena pesada (LC) huMA79bv28	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITC
32	huMA79bv28 LC FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
33	huMA79bv28 LC FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
34	huMA79bv28 LC FR4	FGQGTKVEIKR
35	huMA79bv32 HVR L1	KASQSVDYSGDSFLN
36	huMA79bv32 LC FR2	WYQQKPGKAPKLLFY
37	cadena ligera (Igk) huMA79bv28	DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQSV YEGDSFLN WY QQKPGKAPKL LIYAASNLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THOGLSSPVT KSFNRGEC
38	cadena pesada (IgG1) huMA79bv28	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PIRLDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPC APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPG

ES 2 661 572 T3

39	cadena pesada (IgG1) diseñada por ingeniería con cisteína huMA79bv28 A118C	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRRV PIRLDYWGQG TLVTVSSCST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDCKVEPKSC DKHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG
40	precursor de CD79b humano; N.º de Acc. NP_000617,1; secuencia señal = aminoácidos 1 a 28	MARLALSPVP SHWMVALLLL LSAEPVPAAR SEDRYRNPKG SACSRIWQSP RFIARKRGFT VKMHCYMNSA SGNVSWLWKQ EMDENPQQLK LEKGRMEESQ NESLATLTIQ GIRFEDNGIY FCQQKCNNTS EVYQCGTEL RVMGFSTLAQ LKQRNTLKDQ IIMIQTLII LFIIVPIFLL LDKDDSKAGM EEDHTYEGLD IDQTATYEDI VTLRTGEVVK SVGEHPGQE
41	CD79b maduro humano, sin secuencia señal; aminoácidos 29 a 229	AR SEDRYRNPKG SACSRIWQSP RFIARKRGFT VKMHCYMNSA SGNVSWLWKQ EMDENPQQLK LEKGRMEESQ NESLATLTIQ GIRFEDNGIY FCQQKCNNTS EVYQCGTEL RVMGFSTLAQ LKQRNTLKDQ IIMIQTLII LFIIVPIFLL LDKDDSKAGM EEDHTYEGLD IDQTATYEDI VTLRTGEVVK SVGEHPGQE
42	Anti-CD22 10F4v3 HVR H1	GYEFSRSWMN
43	Anti-CD22 10F4v3 HVR H2	GRIYPGDGDTNYSQKFKG
44	Anti-CD22 10F4v3 HVR H3	DGSSWDWYFDV
45	Anti-CD22 10F4v3 HVR L1	RSSQSIVHSVGNTFLE
46	Anti-CD22 10F4v3 HVR L2	KVSNRFS
47	Anti-CD22 10F4v3 HVR L3	FQGSQFPYT
48	región variable de cadena pesada Anti-CD22 hu10F4v3	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYEFS RSWMNWVRQA PGKGLEWVGR IYPGDGDTNY SGKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARDG SSWDWYFDVW GQGTLVTVSS
49	región variable de cadena ligera Anti-CD22 hu10F4v3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQIV HSVGNTFLEW YQQKPGKAPK LLIYKVSNRFS SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSQFP YTFGQGTKVE IK
50	cadena pesada diseñada por ingeniería con cisteína Anti-CD22 hu10F4v3 A118C	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYEFS RSWMNWVRQA PGKGLEWVGR IYPGDGDTNY SGKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARDG SSWDWYFDVW GQGTLVTVSS CSTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKVEP KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCVSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
(IgG1)		
51	cadena ligera (Igk) Anti-CD22 hu10F4v3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQIV HSVGNTFLEW YQQKPGKAPK LLIYKVSNRFS SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSQFP YTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

ES 2 661 572 T3

52	región Fc de la cadena pesada (IgG1) diseñada por ingeniería con cisteína Anti-CD22 hu10F4v3 S400C	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYEFS RSWMNWVRQA PGKGLEWVGR IYPGDGDTNY SGKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARDG SSWDWYFDVW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKQVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKPK KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDCDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
53	cadena ligera (Igk) diseñada por ingeniería con cisteína Anti-CD22 hu10F4v3 V205C	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRSSQSIV HSVGNTFLEW YQQKPGKAPK LLIYKVSNRG SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSQFP YTFGQGTKEV IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPC TKSFNREGC
56	región Fc de la cadena pesada (IgG1) Anti-CD22 hu10F4v3	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYEFS RSWMNWVRQA PGKGLEWVGR IYPGDGDTNY SGKFKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARDG SSWDWYFDVW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKQVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKPK KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
54	cadena ligera (Igk) diseñada por ingeniería con cisteína huMA79bv28 V205C	DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCASQSVD YEGDSFLNWX YQQKPGKAPK LIYAASNLES GVPSRFSGS SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSNEDPL TFGQGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDYSTYSL STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPCT KSFNREGC
55	cadena pesada (IgG1) diseñada por ingeniería con cisteína huMA79bv28 S400C	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFS SYWIEWVRQA PGKGLEWIGE ILPGGGDTNY NEIFKGRATF SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCTRIV PIRLDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC NVNHNKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCPC APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPVET CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYI LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDC DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genentech, Inc.
- 5 <120> INMUNOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS ANTI-CD79B
- <130> GENE-32633/WO-1/ORD
- 10 <150> US 61/669.270
<151> 09-07-2012
- <160> 56
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 113
- <212> PRT
- 20 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 661 572 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

5

10

ES 2 661 572 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 3
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

ES 2 661 572 T3

Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 4

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

15 <210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 5

ES 2 661 572 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 10 <400> 6

ES 2 661 572 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 7

5

10

ES 2 661 572 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

ES 2 661 572 T3

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

5 <210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 9

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 10

ES 2 661 572 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 11

5

10

ES 2 661 572 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ile	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													

<210> 12
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 12

ES 2 661 572 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 13
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 661 572 T3

20 25 30

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 14

ES 2 661 572 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

5 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 15

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 16

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 1 5 10 15

25 Lys Gly

30 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 661 572 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 17

Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética
<400> 18

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

20 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética
<400> 19

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

30 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética
<400> 20

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

45 <210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética
<400> 21

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

ES 2 661 572 T3

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 10 <400> 22

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
1 5 10 15

Lys Gly

 <210> 23
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Sintética

 <400> 23

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

 25
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 24
 35
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

 <210> 25
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 45
 <400> 25

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

 50 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 661 572 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 26

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

10 <210> 27
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

20 <210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <400> 28

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

35 <210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<400> 29

Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

45 <210> 30
<211> 11

ES 2 661 572 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 30

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

10 <210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

20 <400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

25 <210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 32

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

35 <210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<400> 33

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

45 **Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys**
20 25 30

50 <210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 661 572 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 34

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

10 <210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 35

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

20 <210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

<400> 36

30 **Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Phe Tyr**
1 5 10 15

35 <210> 37
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<400> 37

ES 2 661 572 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu
 20 25 30
 Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 38
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

ES 2 661 572 T3

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

ES 2 661 572 T3

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

ES 2 661 572 T3

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 39
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 39

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

5

10

ES 2 661 572 T3

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

ES 2 661 572 T3

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 40
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu
 20 25 30

Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln
 35 40 45

Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His
 50 55 60

Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln
 65 70 75 80

Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met
 85 90 95

Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile
 100 105 110

Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn
 115 120 125

Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly
 130 135 140

Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly
 145 150 155 160

Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro
 165 170 175

10

ES 2 661 572 T3

Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu
 180 185 190

Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
 195 200 205

Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu
 210 215 220

His Pro Gly Gln Glu
 225

<210> 41
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 41

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
 1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
 20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
 35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
 50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
 100 105 110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
 115 120 125

Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
 130 135 140

Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
 145 150 155 160

10

ES 2 661 572 T3

Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr
165 170 175

Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp
180 185 190

Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu
195 200

5 <210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética
<400> 42

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
1 5 10

15 <210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética
<400> 43

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
1 5 10 15

25 Lys Gly
<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética
35 <400> 44

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40 <210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

ES 2 661 572 T3

<400> 45

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

5 <210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 46

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

15 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <400> 47

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 48
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
50 55 60

ES 2 661 572 T3

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

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

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

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

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 50

ES 2 661 572 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 661 572 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

- 5
- <210> 51
 - <211> 219
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - <223> Sintética

ES 2 661 572 T3

<400> 51

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

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

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

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

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 52
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

5 <400> 52

ES 2 661 572 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

ES 2 661 572 T3

```

225                230                235                240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                250                255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
                260                265                270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                280                285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                290                295                300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                310                315                320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                330                335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                340                345                350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                355                360                365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                370                375                380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                390                395                400

Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                410                415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                420                425                430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                435                440                445

Gly Lys
                450

```

<210> 53
 <211> 219
 <212> PRT

5

ES 2 661 572 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

5

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

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

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

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

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ES 2 661 572 T3

- <210> 54
- <211> 218
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Sintética

- 10 <400> 54

ES 2 661 572 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu
 20 25 30
 Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 55
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

ES 2 661 572 T3

<223> Sintética
<400> 55

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

ES 2 661 572 T3

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 56
 <211> 450

ES 2 661 572 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintética

<400> 56

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

ES 2 661 572 T3

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

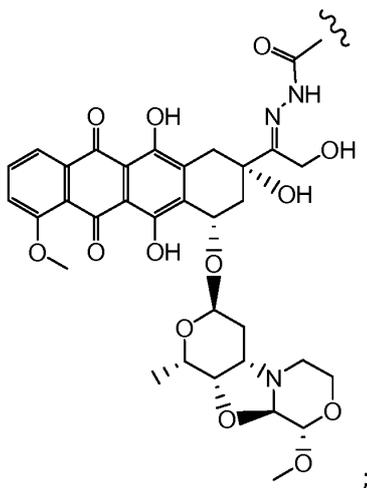
Gly Lys
 450

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado que tiene la fórmula Ab-(L-D)_p, en la que

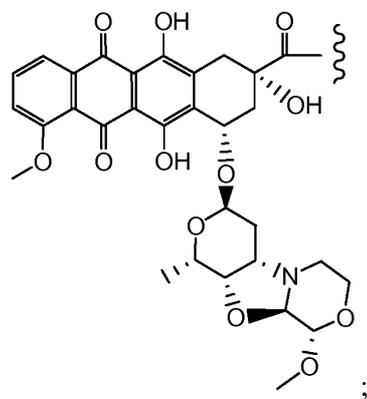
- 5 (a) Ab es el anticuerpo;
 (b) L es un conector;
 (c) D es el agente citotóxico; y
 (d) p varía de 1-8;

10 en el que D tiene una estructura seleccionada de:



y

15



y

20

Ab es un anticuerpo que une CD79b humano, en donde el anticuerpo comprende

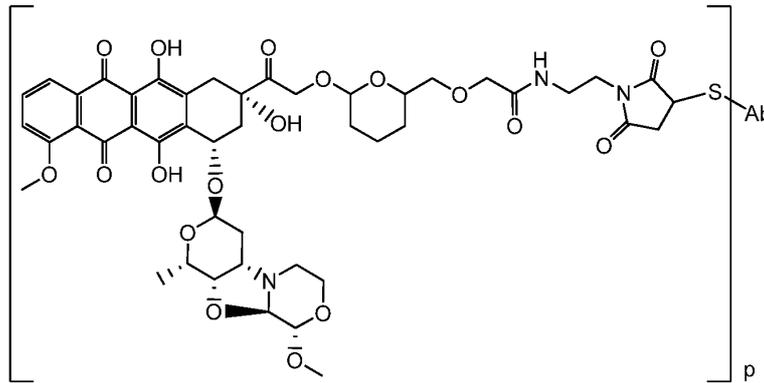
- 25 (a) (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (iv) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18, 24 y 35, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o
- 30 (b) (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o
- 35 (c) una secuencia VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11; o
- d) una secuencia VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12; o
- e) una secuencia VH como en (c) y una secuencia VL como en (d); o
- f) una secuencia VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 11 y 13; o

- g) una secuencia VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8, 10, 12 y 14; o
 h) una secuencia VH como en (f) y una secuencia VL como en (g); o
 i) una secuencia VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o
 j) una secuencia VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; o
 5 k) una secuencia VH como en (i) y una secuencia VL como en (j).

2. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en el que conector es escindible por proteasa, en donde el conector comprende opcionalmente un dipéptido val-cit.

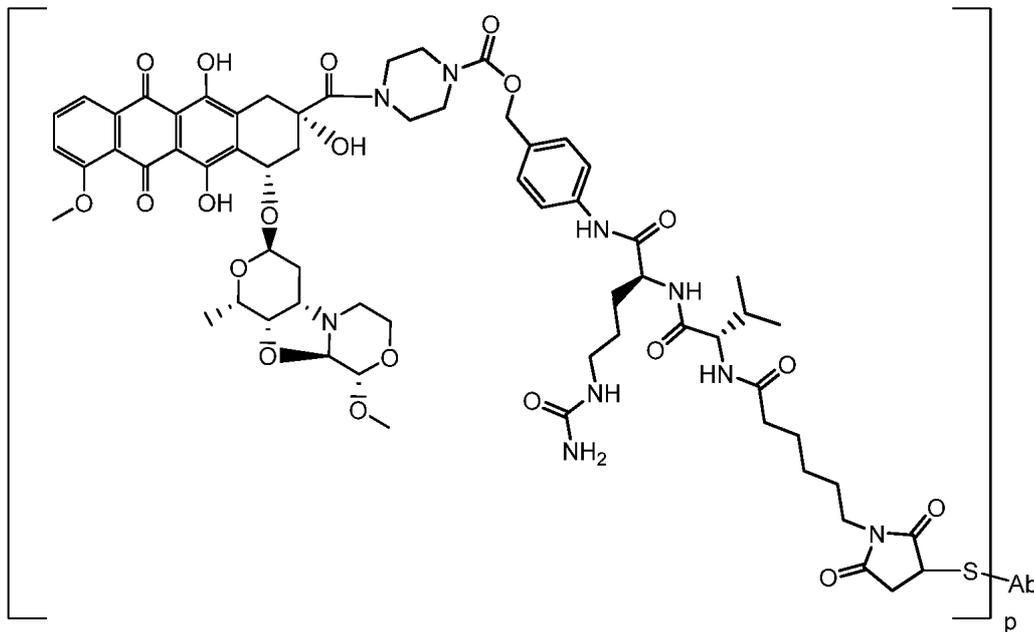
10 3. El inmunoconjugado de la reivindicación 1, en el que el conector es lábil al ácido, en donde el conector comprende opcionalmente hidrazona.

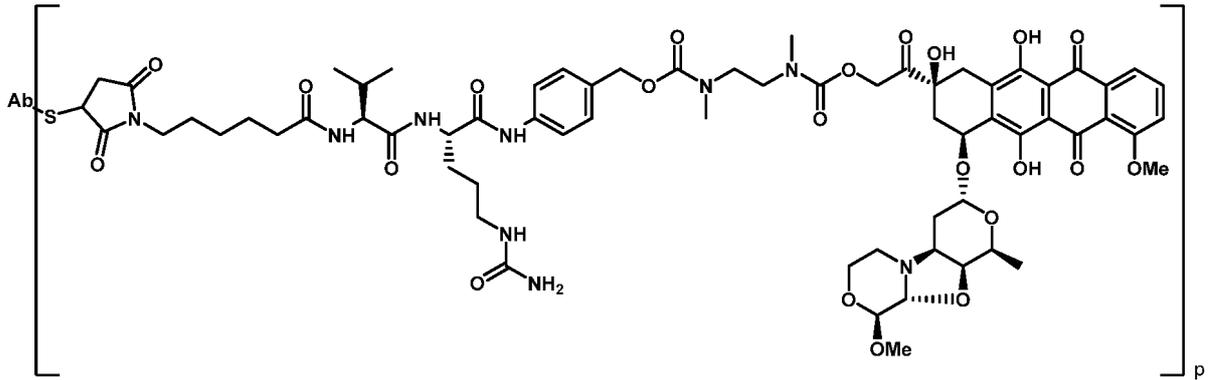
4. El inmunoconjugado de la reivindicación 1 que tiene una fórmula seleccionada de:



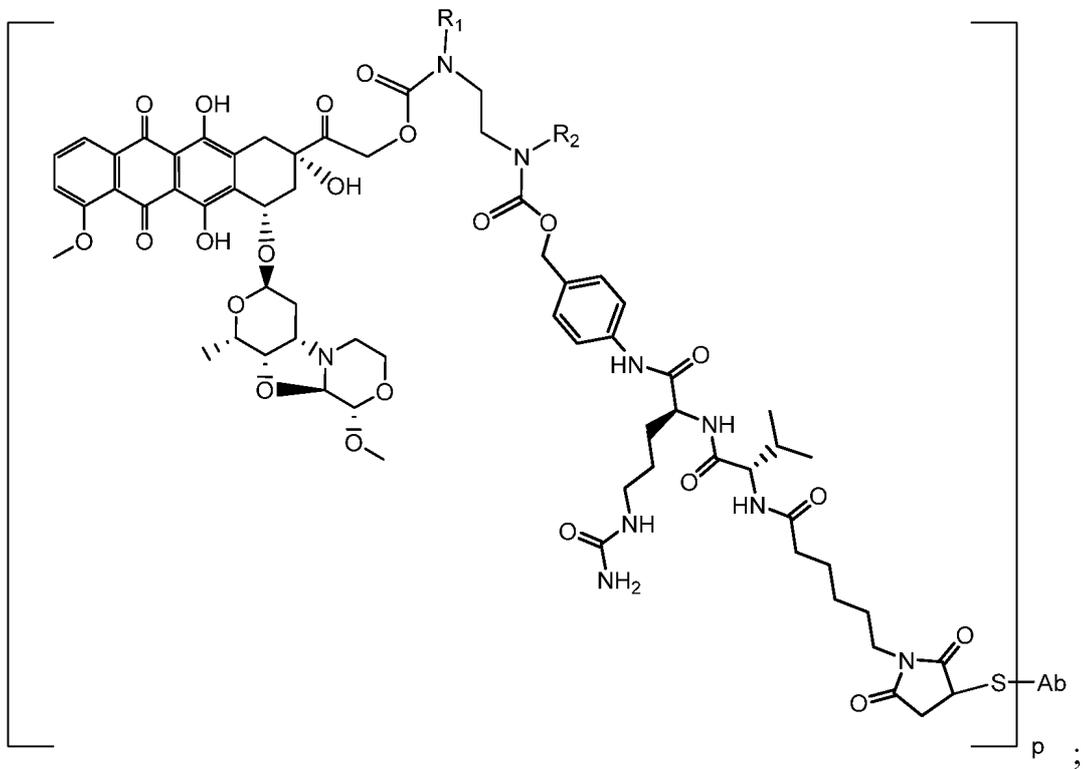
15

;

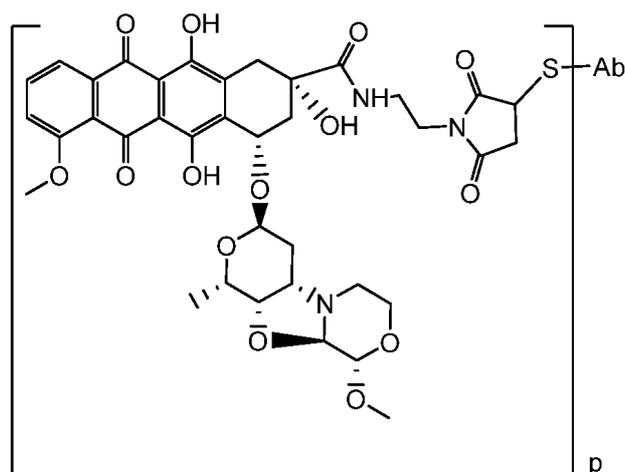




;



5 y



5. El inmunoconjugado de la reivindicación 4, en el que Ab es un anticuerpo que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (iv) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, (v) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y (vi) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y en donde p varía de 1 a 3.
6. El inmunoconjugado de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 11 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 12.
7. El inmunoconjugado de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 37.
8. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el CD79b humano tiene la secuencia de SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41.
9. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método para tratar a un individuo que tiene un cáncer positivo a CD79b.
11. El inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 10, en el que el cáncer positivo a CD79b se selecciona de linfoma, linfoma no hodkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo reincidido, NHL reincidido indolente, NHL refractario, NHL refractario indolente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Burkitt y linfoma de células del manto.
12. El inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el cáncer positivo a CD79b es resistente a un primer agente terapéutico, en donde el primer agente terapéutico es un primer inmunoconjugado que comprende un primer anticuerpo y un primer agente citotóxico.
13. El inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 12, en el que el primer anticuerpo une CD22.
14. El inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el primer agente citotóxico y el agente citotóxico del inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 son diferentes.
15. El inmunoconjugado para el uso de la reivindicación 14, en el que el primer agente citotóxico es MMAE.
16. El inmunoconjugado para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el cáncer positivo a CD79b expresa la glucoproteína P (P-gp).

Secuencias VH

Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104
humIII MA79b	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									
Injerto huMA79b	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									
huMA79b.v17	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									
huMA79b.v18	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									
huMA79b.v28	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									
huMA79b.v32	Q	K	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	V	P	V	Y	R	F	D	Y	M	G									



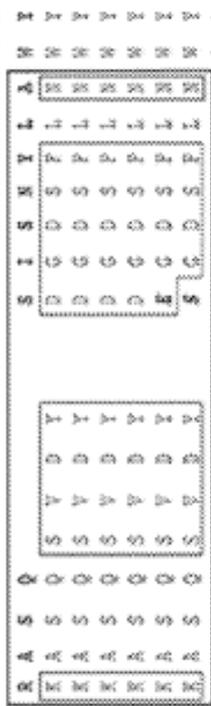
Kabat# 105 106 107 108 109 110 111 112 113

humIII MA79b	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEQ ID NO:
Injerto huMA79b	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	1
huMA79b.v17	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	3
huMA79b.v18	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	5
huMA79b.v28	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	7
huMA79b.v32	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	9

FIG. 1B

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	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
huk1	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
MA79b	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
Injerto huMA79b	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
huMA79b.v17	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
huMA79b.v18	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
huMA79b.v28	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q
huMA79b.v32	D	I	Q	H	T	Q	S	P	S	L	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	E	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	T	Q



Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	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		
huk1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
MA79b	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
Injerto huMA79b	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
huMA79b.v17	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
huMA79b.v18	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
huMA79b.v28	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G
huMA79b.v32	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	E	I	A	R	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	P	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G

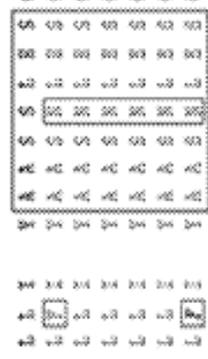
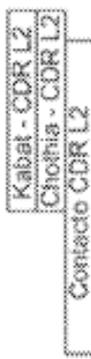


FIG. 2A

Cadena Ligera huMA79bv28

DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVDYEGDSFLNWFYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 37

Cadena Pesada huMA79bv28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRA
TFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG SEQ ID NO: 38

FIG. 3

Tio-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG SEQ ID NO: 39

Tio-huMA79b.v28-LC-V205C (LC)

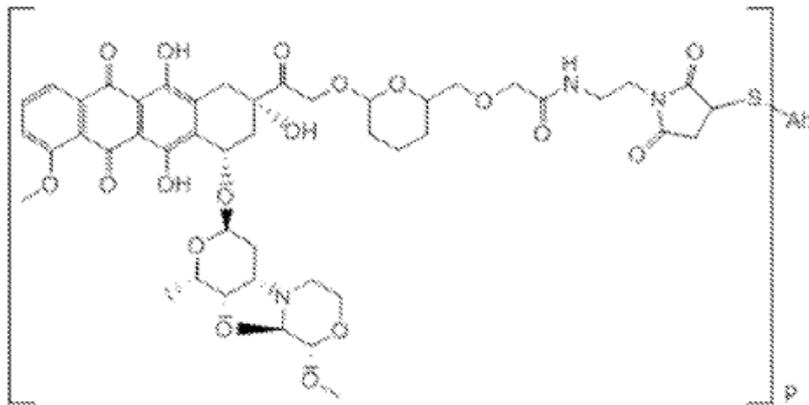
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCT
KSFNRGEC SEQ ID NO: 54

Tio-huMA79b.v28-HC-S400C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATF
SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 55

FIG. 4

A Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-acetal-PNU-159682 (“huMA79bv28-PNU-2”)



B Tio huMA79bv28 HC A118C-MC-val-cit-PAB-PNU-159682 (“huMA79bv28-PNU-1”)

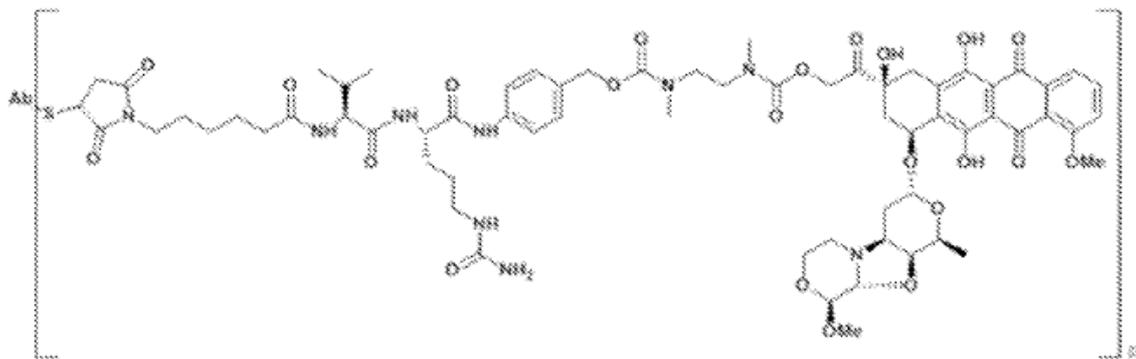


FIG. 5

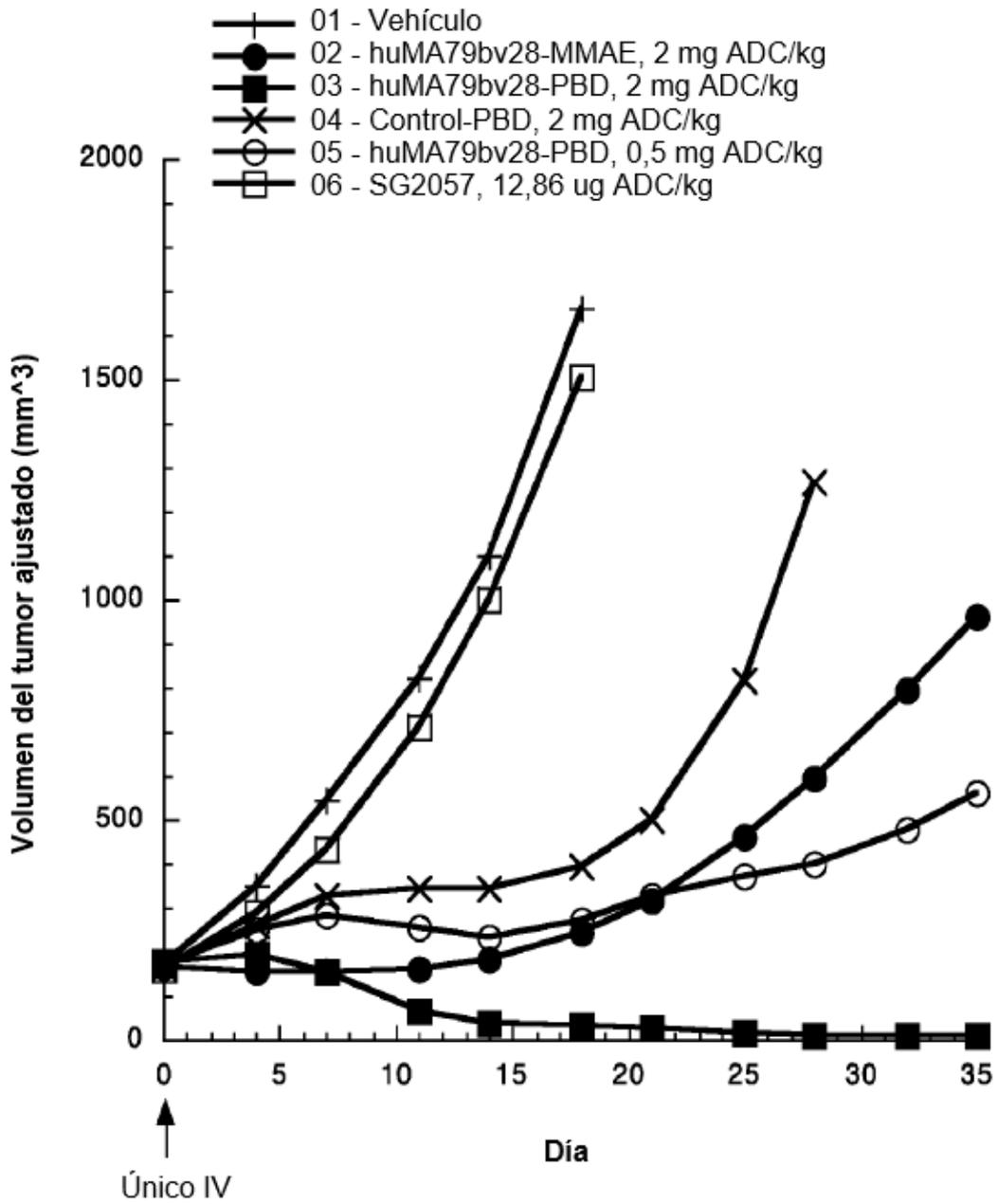


FIG. 6

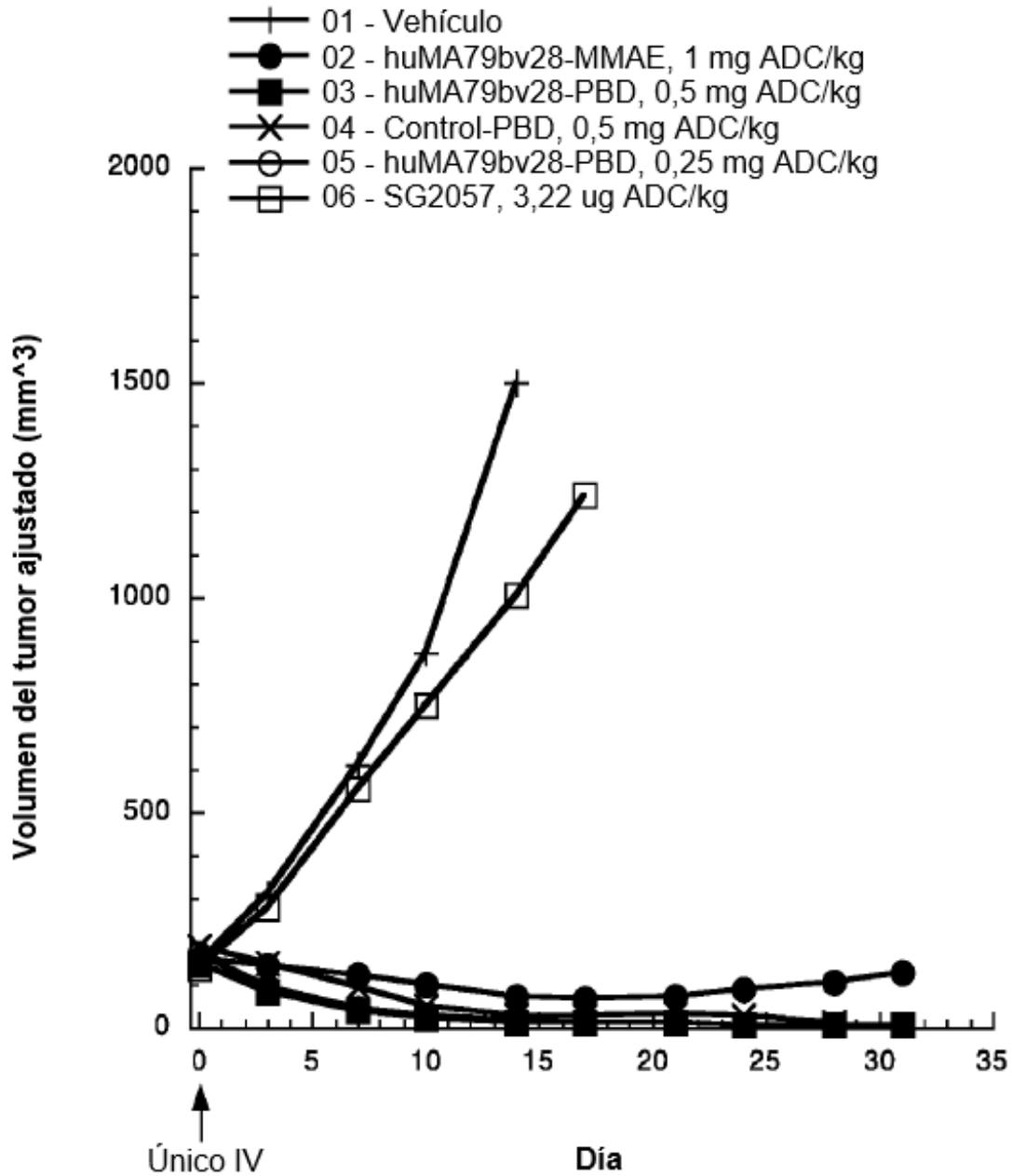


FIG. 7

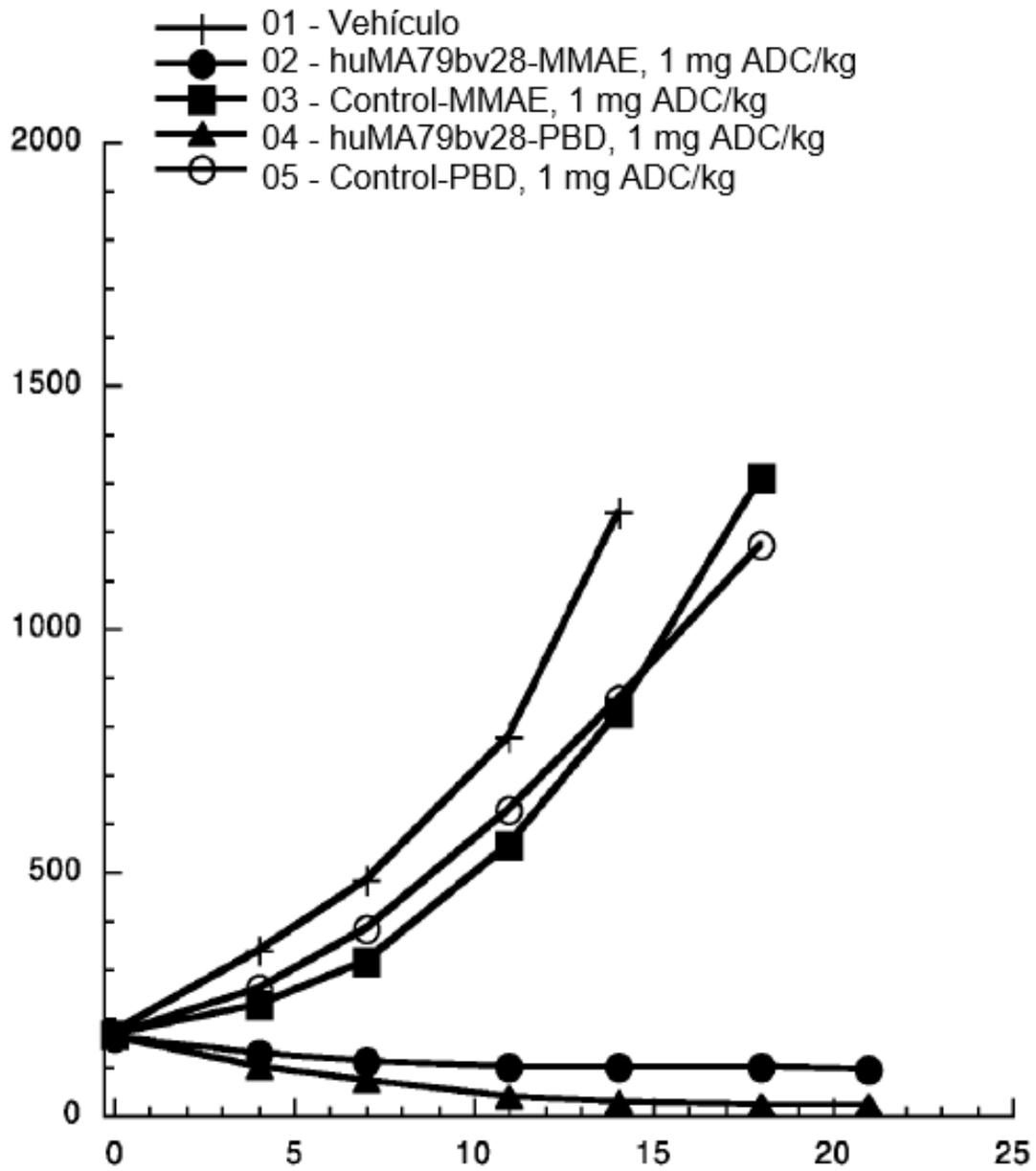


FIG. 8

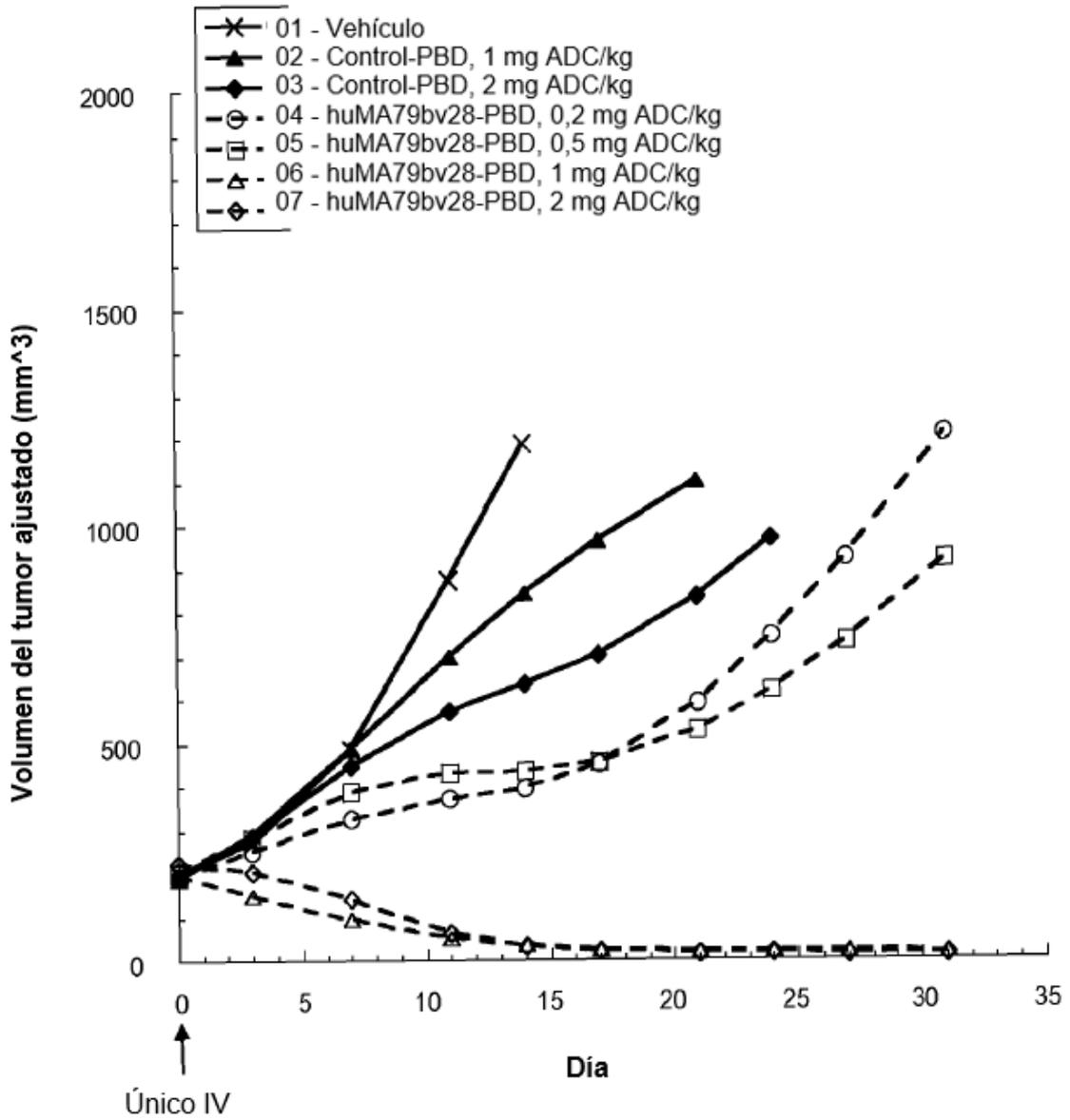


FIG. 9

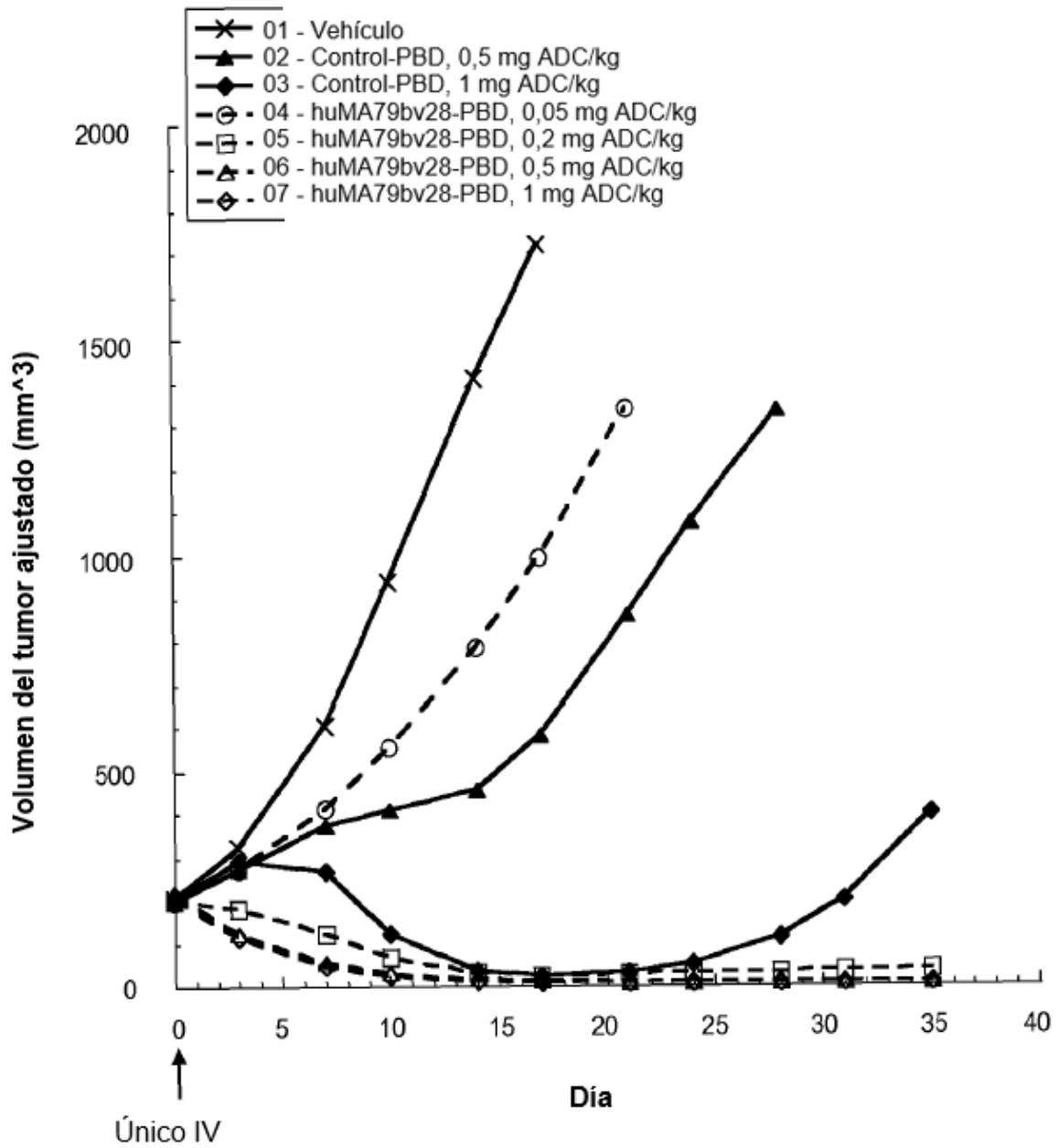


FIG. 10

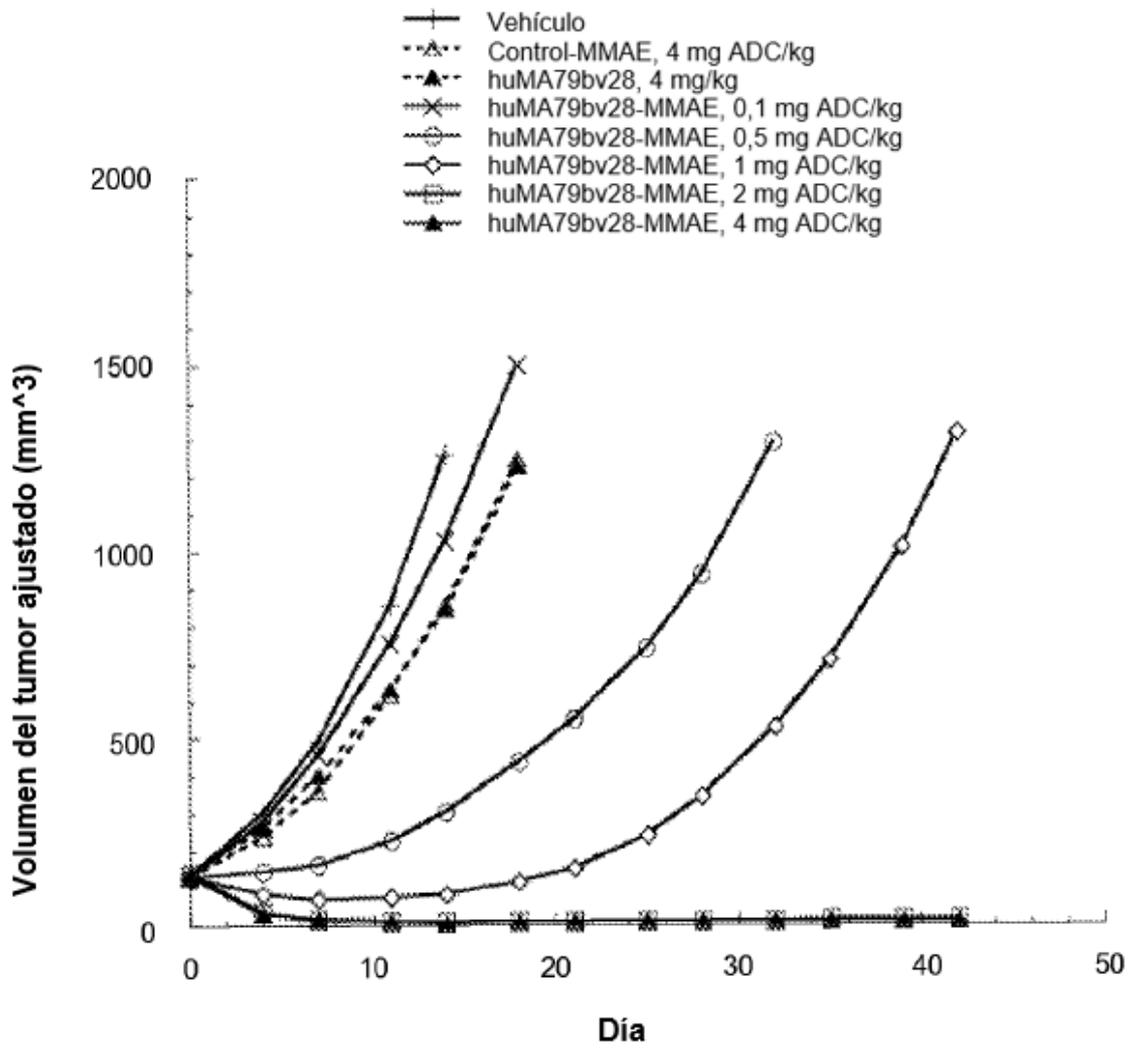


FIG. 11

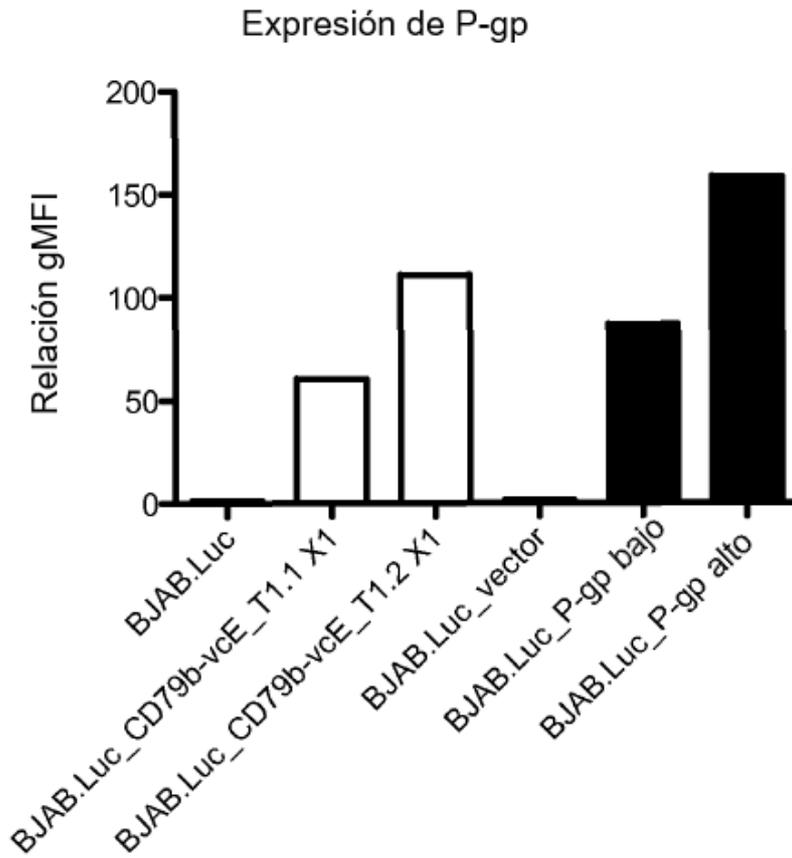


FIG. 12

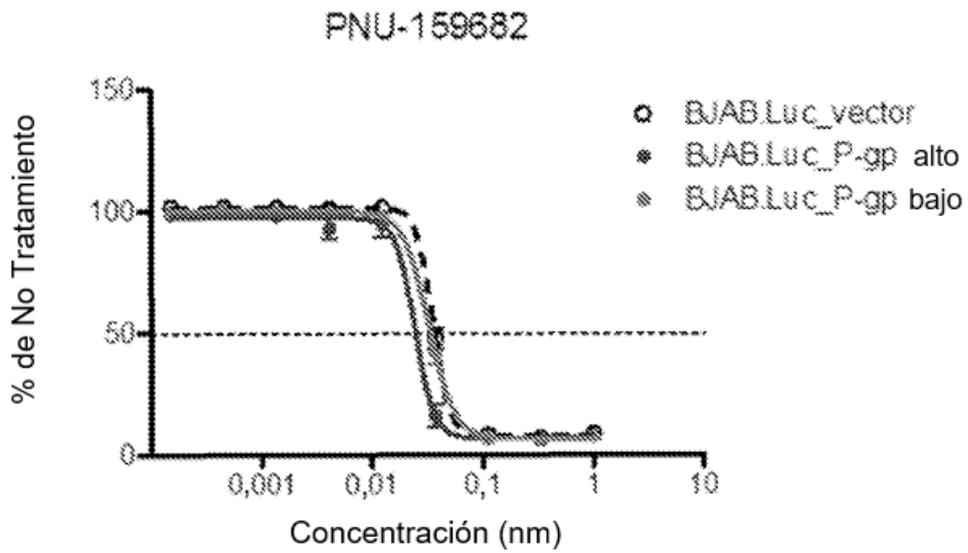


FIG. 13