Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. 10-9432

54. TÍTULO: **"ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE : **GENENTECH, INC.**

DOMICILIO: SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. [illegible] 2010

(FORMA P 10).

Cuad. No Exam.
to 16-02-2010

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-009432- -00000-0000
Fecha: 2010-01-29 16:29:37 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 427

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: South San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: CHEN, Yvonne; DENNIS, Mark; ELKINS, Kristi; JUNUTULA, Jagath Reddy; POLSON, Andrew; ZHENG, Bing. Dirección: 222 8th Avenue #320, San Mateo, California 94401; 120 Plymouth Avenue, San Carlos, California 94070; 145 Bonview Street, #A, San Francisco, California 94110; 34391 Tupelo Street, Fremont, California 94555; 281 Berkeley Way, San Francisco, California 94115 y 156 Montelena Court, Mountain View, California 94040. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/070061 Fecha: 15-07-08

Publicación Internacional No. WO 2009/012256 A1 Fecha: 22-01-09

⑥ Título (54) **"ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO"**

⑦ Clasificación Internacional (51) C07K 16/28 A61P 35/02, A61K 47/48

⑧ Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	16-07-07	60/950,088

⑨ Comprobante de Pago No. 09-97,014 y 10-573 **Fecha:** 23-12-09 y 05-01-2010

1

MFR

(10) ANEXOS

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

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-009432- -00000-0000

Fecha: 2010-01-29 16:29:37 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 427

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 97,014
FECHA : DICIEMBRE 23 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	36707905	23/12/2009	19,160,000.00

***** C O N C E P T O *****

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

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 573
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-009432- -00000-0000

Fecha: 2010-01-29 16:29:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 427

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062784387	36907984	05/01/2010	5.238,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005 01-01 SOLICITUDES	990	VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#O ANTR	14.000,00
			TOTAL : $	14.000,00

SON: CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

P... O DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

3

ANEXO

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

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Traducción Oficial Nº 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: **258054**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174484

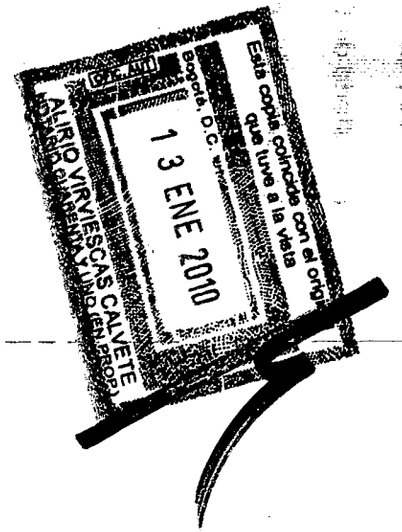
Ilba Espana

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

N. del T.:. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

B

Traducción Oficial Nº 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

7

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL CONTENIDO

2005 OCT 31 A 6:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

1700185

COTEJADA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

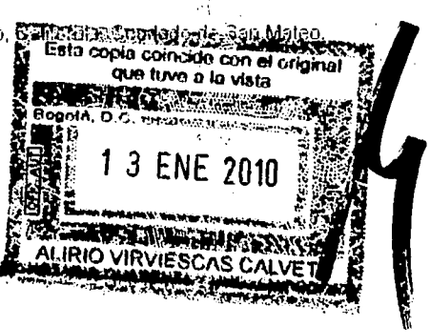
Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.



OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power
Fecha: 9/13/2005
Número de páginas: 1
Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. – Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-193

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174487

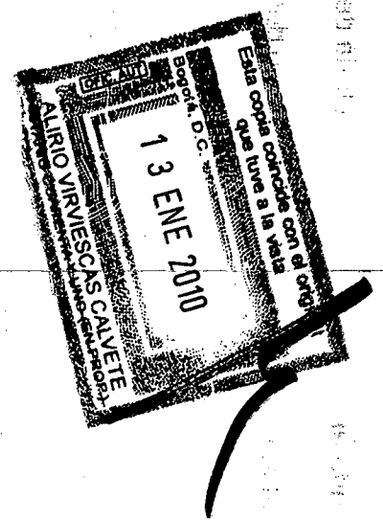
Ilbar Espgrd

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre,1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

ARTICULO 4

SECCI0N 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria. (a) Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCION 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistente con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluído, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de la serie) o

Esto corresponde en forma fiel y completa al documento que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

BLANCA ESPAÑOL ESTEVEZ
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

13

disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluído, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

EBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales

Este copia coincide con el original
que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
AURIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
AURIO VIRVIESCAS CALVETT
NOTARIO CUARENTA Y CINCO

procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
AURIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAF A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

AB

ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 6920
Agosto de 1996

que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ELEAF A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas , asociaciones y otras entidades diferentes de la

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 6920
Agosto de 1996

Esta es fiel copia de la que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre

Este copia coincide con el original
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

ILEAF A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ELBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial No. 0920
Agosto de 1996

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de

Esta copia coincide con el original
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETT

ILEANA A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio de Justicia No. 0920
Agosto de 1996

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante*. Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8*. Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

LBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá
13 ENE 2010
ILIRIO VIRVIESCAS CALVET

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

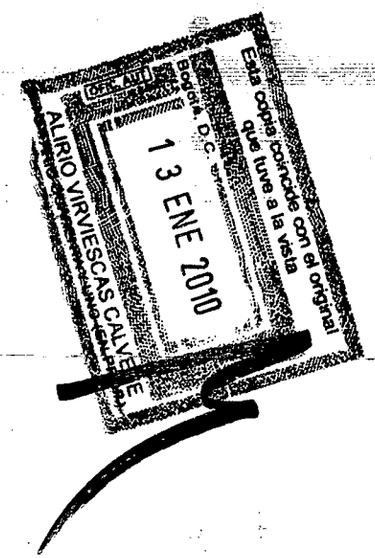
174488

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

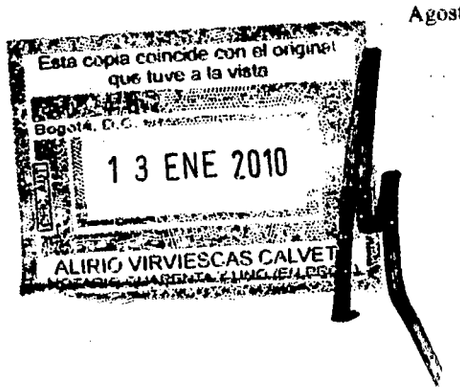
Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office, Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



27

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS C

ALIRIO A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Bogotá, D.C. 13 ENE 2010

ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

R A. ESPAÑOL ESPAÑOL
raductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
ación Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado "Secretary of State Secretary's Office - Delaware"

Esta copia corresponde al que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

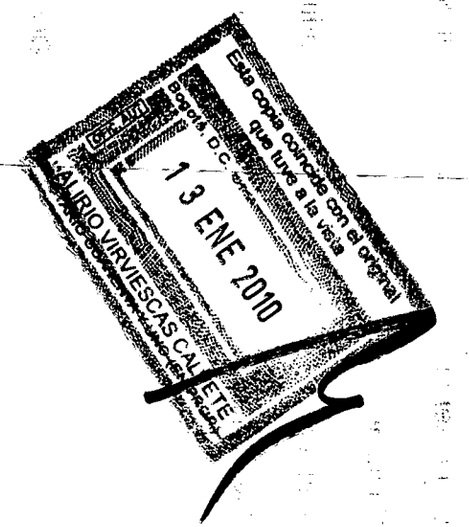
17448

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.N. PR.)

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es trescientos millones

Es fiel copia del documento original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

ILSE A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

32

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETT

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265286**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado en relieve "Secretary's Office - Delaware"

Esta copia coincide con el/los documento(s) que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174490

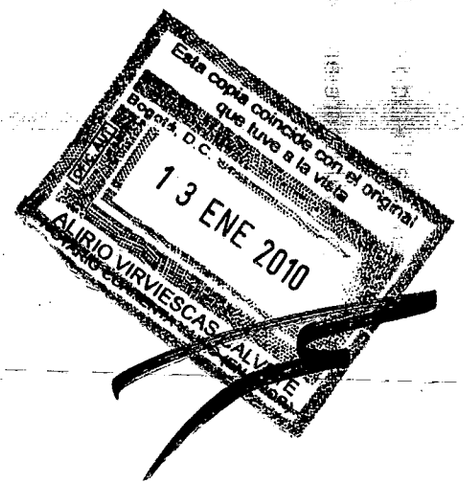
Ilbar Español

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
AURIO VIRVIESCAS CALVETT

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 07:39 PM 04/16/2004
040281669 – 2112549

CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

JILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia concuerda con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

ALBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

State of California

SECRETARY OF STATE

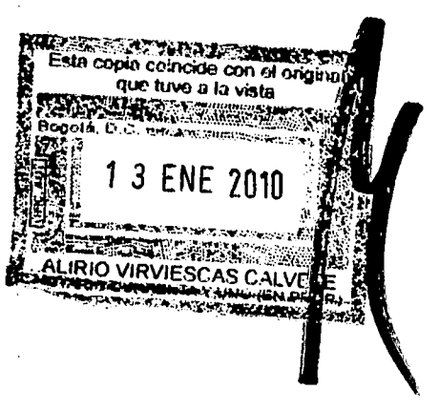
APOSTILLE

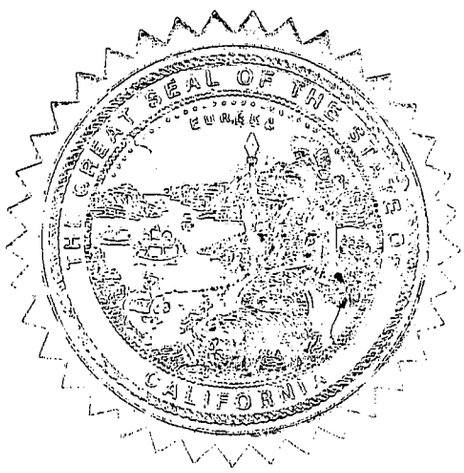
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 25805-I*
9. *Seal/Stamp:*





10. Signature

Bruce McPherson

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 9/13/2005 (Date:) before me, Teri Lee, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she~~/they executed the same in his/~~her~~/their authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her~~/their signature(s) on the instrument the person(~~s~~), or the entity upon behalf of which the person(~~s~~) acted, executed the instrument.

TERI LEE
Commission # 1514234
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Sep 18, 2008

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colegiatura Renewal

Document Date: 9/13/2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: None

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.
Una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware [illegible], Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Dado y firmado a los 13 días de Sep. 2005

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under the laws od State of Delaware [illegible], E.U.A

domiciled at

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Given and signed this 13 Sept 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

Es fiel copia que coincide con el original que tuve a la vista
1 3 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALV[illegible] TE

(2)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

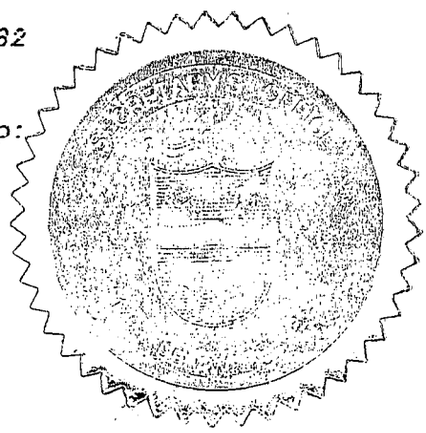
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265282

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

que tuve a la vista

Bogotá, D.C.

13 ENE 2010

ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

(4)

Delaware

The First State

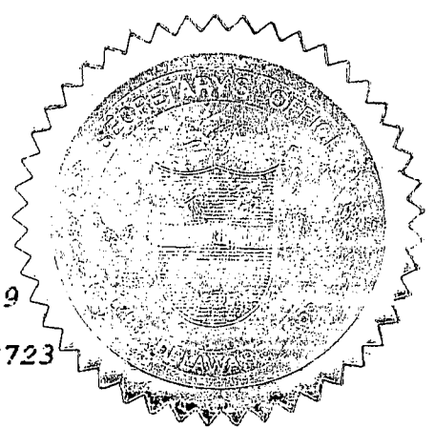
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05

(3)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265283

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista

Bogotá, D.C.

15 ENE 2010

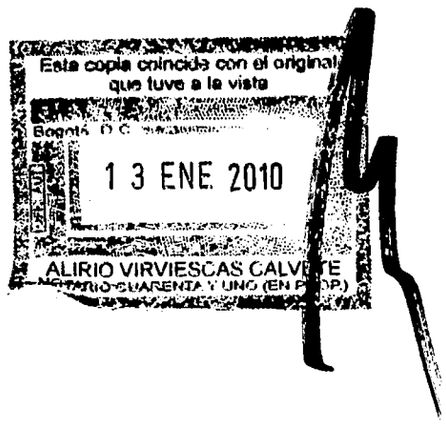
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

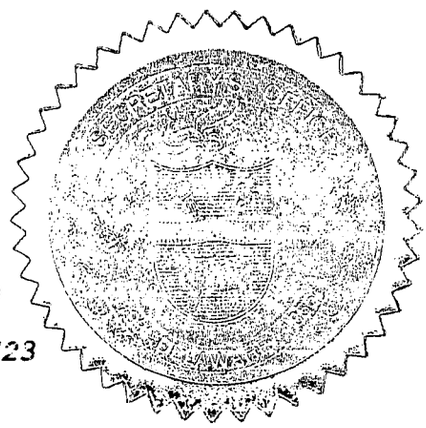
162

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 – 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

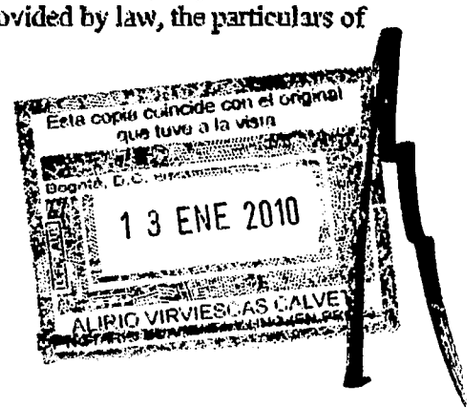
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Prefened Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVO

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

51

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVET

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Notaría [illegible]
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
[illegible] ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

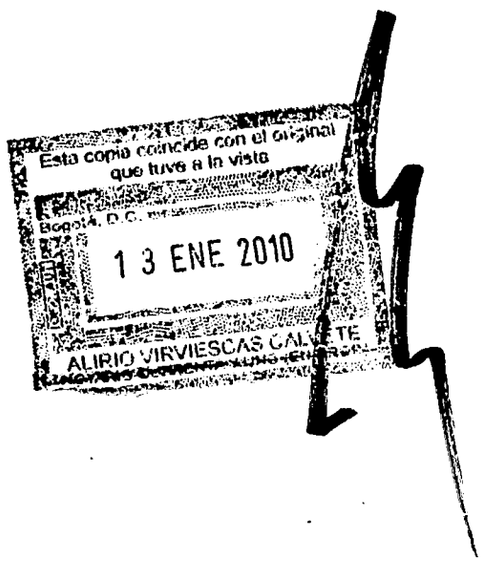
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



(4)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

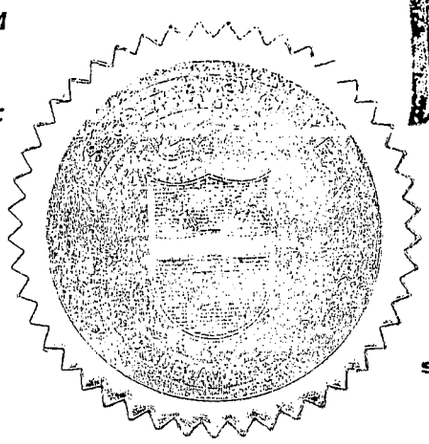
5. at Dover, Delaware

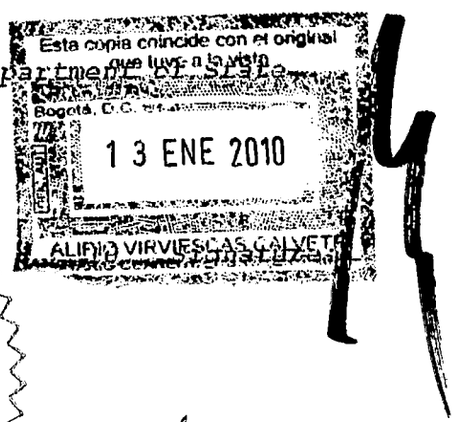
6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265284

9. Seal/Stamp:





Harriet Smith Windsor

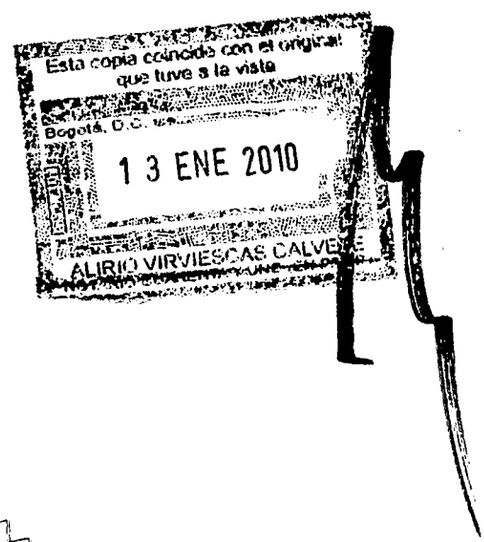
Secretary of State

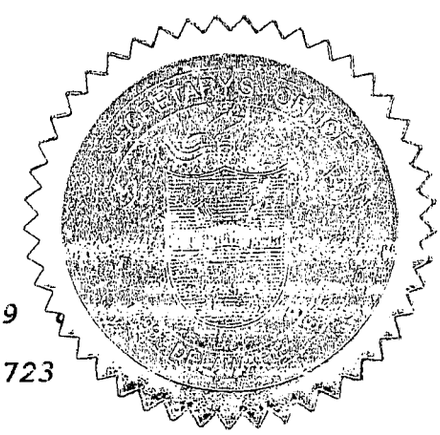
194

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

Esta copia concuerda con el original
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

75841

(5)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

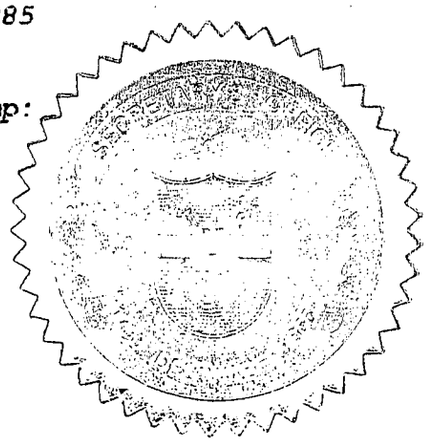
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265285

9. Seal/Stamp:



10. Signature:



95

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

2112549

050823723

6o

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010253224 – 2112549

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 05/10/2001
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND. That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

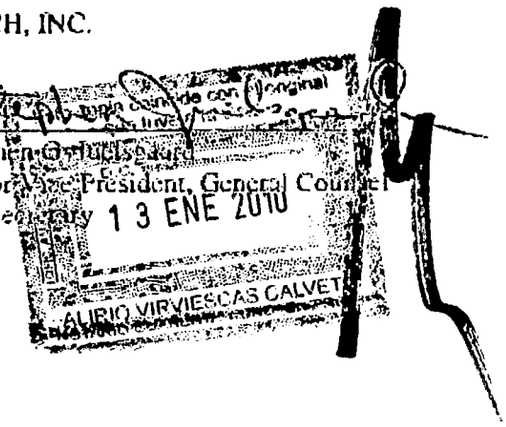
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary



86747

61

(6)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Esta copia coincide con el original que hoy a la vista

Bogotá, D.C.

13 ENE 2010

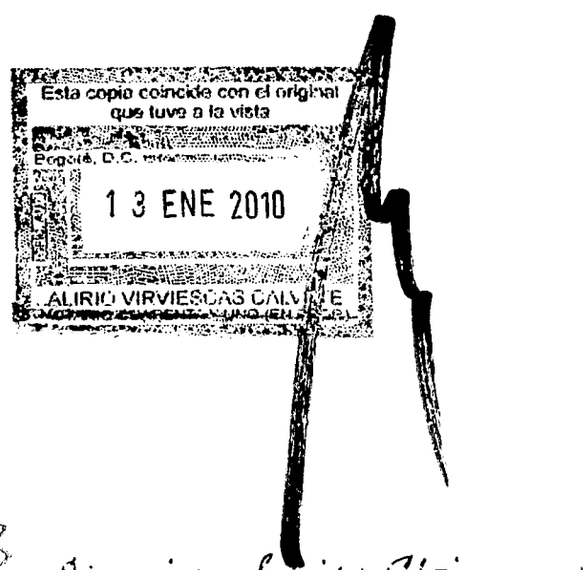
ALIRIO VIRVIESCAS CALVE

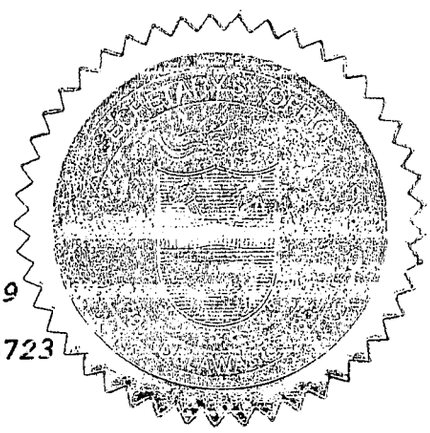
196

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.





2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040291669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel

Este color coincide con el original
Bogotá, D.C.
13 ENE 2010
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

#152097

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) No. de solicitud:	(51) Int Cl: **C07K 16/28**
(22) Fecha de solicitud: 29-01-2010 (30) Prioridad (31) **No. Prioridad** (32) **Fecha** (33) **País** 60/950,068 16-07-07 US	(71)Solicitante(s): **GENENTECH, INC.** (72) Inventor(es): CHEN, Yvonne; DENNIS, Mark; ELLINS, Kristi; JUNUTULA, Jagath Reddy; POLSON, Andrew; ZHENG, Bing. (74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-02-2010 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 15-07-08 No. de solicitud: **PCT/US2008/070061**	(87) Publicación internacional Fecha: 22-01-09 No. publicación: **WO 2009/012256 A1**

(54) Título: **"ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO"**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo anti-CD79b que comprende:

(a) al menos una secuencia HVR seleccionada entre el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A16, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º: 59)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (identificador de secuencia n.º: 63)

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F6 es ARNLYL (identificador de secuencia n.º: 64); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia nos.: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) N° de solicitud:
(22) Fecha de solicitud: 29-01-2010
(51) Clasificación Internacional : C07K 16/28

(71)Solicitante(s) **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es) CHEN, Yvonne; DENNIS, Mark; ELFINS, Kristi; JUNUTULA, Jagath Reddy; POLSON, Andrew; ZHENG, Bing.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	32) ***Fecha***	(33) ***País***
	60/950,088	**16-07-07**	**US**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-02-2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **15-07-08**
No. de solicitud ***PCT/US2008/070061***

(87) Publicación internacional
Fecha: **22-01-09**
N° publicación: ***WO 2009/012256 A1***

(54) Titulo: **"ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO"**

66

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ___ PCT X MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-01-2010

(51) Clasificación Internacional : C07K 16/28

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es) CHEN, Yvonne; DENNIS, Mark; ELKINS, Tristi; JUNUTULA, Jagath Reddy; POLSON, Andrew; ZHENG, Bing.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País***
60/950,088 **16-07-07** **US**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 16-02-2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 15-07-08
No. De solicitud ***PCT/US2008/070061***

(87) Publicación internacional:
Fecha: 22-01-09
No. Publicación : **WO 2009/012256 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: **"ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo anti-CD79b que comprende:

(a) al menos una secuencia HVR seleccionada entre el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A16, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º: 59)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E16, donde E1-E16 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (identificador de secuencia n.º: 63)

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F6 es ARNLYL (identificador de secuencia n.º: 64); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia nos.: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64.

67

GNE-0347 WO BAILEY GRAY/KV

RECEIVED
DEC 09 2008
GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
Genentech, Inc.
Attn. Young, Bonny G.
1 DNA Way MS-49
South San Francisco CA 94080-4990
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DEC 16 2008

Genentech Prod

Applicant's or agent's file reference: P5112R1 WO	Date of mailing (day/month/year): 09/12/2008
International application No.: PCT/US2008/070061	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International filing date (day/month/year): 15/07/2008	
Applicant: GENENTECH, INC.	

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

[ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

[ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 20 **months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016	Katharina Leineweber

Form PCT/ISA/220 (October 2005) *(See notes on accompanying sheet)*

68

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims,description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped),whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1–10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43*bis*.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
P5112R1 WO		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2008/070061	15/07/2008	16/07/2007
Applicant		
GENENTECH, INC.		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the International search was carried out on the basis of:
      [X] the International application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the International application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of International search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This International search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the International application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 2
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/070061

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/070061

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present invention is directed to humanized and conjugated antibodies against CD79b useful for the treatment of hematopoietic tumor in mammals and to methods of using those antibodies for the same.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/070061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/13 A61K47/48 A61P35/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K C12N A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	US 2007/207142 A1 (CROWLEY CRAIG [US] ET AL) 6 September 2007 (2007-09-06) cited in the application	
A	US 5 644 033 A (SEON BEN K [US]) 1 July 1997 (1997-07-01)	
X	WO 01/71005 A (KUFER PETER [DE]; RIETHMUELLER GERT [DE]; LUTTERBUESE RALF [DE]; BORSC) 27 September 2001 (2001-09-27) sequences 13,14,47	33-38
Y	WO 01/31065 A (SCRIPPS RESEARCH INST [US]; BARBAS CARLOS F III [US]; RADER CHRISTOPH) 3 May 2001 (2001-05-03) the whole document	1-32, 39-57, 59-179

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 November 2008	09/12/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. (+31-70) 340-3016	Vadot, Pierre

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/070061

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/081711 A (SEATTLE GENETICS INC [US]; DORONINA SVETLANA O [US]; SENTER PETER D [U) 9 September 2005 (2005-09-09) claim 115	
X	POLSON ANDREW G ET AL: "Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma." 15 July 2007 (2007-07-15), BLOOD 15 JUL 2007, VOL. 110, NR. 2, PAGE(S) 616 - 623 , XP002503252 ISSN: 0006-4971	58
Y		1-32, 39-57, 59-179

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/070061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007207142 A1	06-09-2007	NONE	
US 5644033 A	01-07-1997	CA 2110852 A1	23-06-1994
		EP 0603735 A2	29-06-1994
		JP 7126300 A	16-05-1995
WO 0171005 A	27-09-2001	AU 6015301 A	03-10-2001
		AU 2001260153 B2	17-08-2006
		CA 2406993 A1	27-09-2001
		CN 1423700 A	11-06-2003
		CZ 20023203 A3	13-08-2003
		HU 0300919 A2	28-07-2003
		JP 2004500108 T	08-01-2004
		NO 20024489 A	19-11-2002
		PL 358215 A1	09-08-2004
		US 2004038339 A1	26-02-2004
WO 0131065 A	03-05-2001	NONE	
WO 2005081711 A	09-09-2005	AU 2004316290 A1	09-09-2005
		BR PI0416028 A	02-01-2007
		CA 2543888 A1	09-09-2005
		EP 1725249 A2	29-11-2006
		JP 2007514652 T	07-06-2007
		KR 20060111473 A	27-10-2006
		US 2008248053 A1	09-10-2008
		US 2008248051 A1	09-10-2008
		US 2008226657 A1	18-09-2008
		US 2005238649 A1	27-10-2005

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 January 2009 (22.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/012256 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/070061

(22) International Filing Date: 15 July 2008 (15.07.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/950,088 16 July 2007 (16.07.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CHEN, Yvonne** [US/US]; 222 8th Avenue #320, San Mateo, California 94401 (US). **DENNIS, Mark** [US/US]; 120 Plymouth Avenue, San Carlos, California 94070 (US). **ELKINS, Kristi** [US/US]; 145 Bonview Street #A, San Francisco, California 94110 (US). **JUNUTULA, Jagath Reddy** [IN/US]; 34391 Tupelo Street, Fremont, California 94555 (US). **POLSON, Andrew** [US/US]; 281 Berkeley Way, San Francisco, California 94115 (US). **ZHENG, Bing** [CN/US]; 156 Montelena Court, Mountain View, California 94040 (US).

(74) Agents: **Ginger R, Dreger** et al.; GoodwinProcter LLP, 135 Commonwealth Drive, Menlo Park CA 94025 (US).

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

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

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED ANTI-CD79B ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

DNA225786

MARLALSPVPSFVMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VTMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Signal sequence.
amino acids 1-28.

Transmembrane domain.
amino acids 5-25, 159-179.

Immunoglobulin domain.
amino acids 58-124.

Immunoreceptor tyrosine-based activation motif.
amino acids 193-213.

N-glycosylation site.
amino acids 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

Protein kinase C phosphorylation site.
amino acids 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

Casein kinase II phosphorylation site.
amino acids 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

Tyrosine kinase phosphorylation site.
amino acids 113-120.

N-myristoylation site.
amino acids 40-45, 118-123.

FIG. 2

(57) Abstract: The present invention is directed to humanized and conjugated antibodies against CD79b useful for the treatment of hematopoietic tumor in mammals and to methods of using those antibodies for the same.

WO 2009/012256 A1

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2008/070061	15.07.2008	16.07.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/13 A61K47/48 A61P35/02

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☑ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☑ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☑ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	see form PCT/ISA/210	Vadot, Pierre Telephone No. +31 70 340-3963

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2008/070061

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☑ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☒ filed together with the international application in electronic form.

      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☑ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Bo

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-32,39-57,59-179
	No:	Claims	33-38,58
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-179
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-74,99-159,165-179
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

5.1 Reference is made to the following documents:

D1: US 2007/207142 A1 (CROWLEY CRAIG [US] ET AL) 6 September 2007 (2007-09-06) cited in the application

D2: US-A-5 644 033 (SEON BEN K [US]) 1 July 1997 (1997-07-01)

D3: WO 01/71005 A (KUFER PETER [DE]; RIETHMUELLER GERT [DE]; LUTTERBUESE RALF [DE]; BORSO) 27 September 2001 (2001-09-27)

D4: WO 01/31065 A (SCRIPPS RESEARCH INST [US]; BARBAS CARLOS F III [US]; RADER CHRISTOPH) 3 May 2001 (2001-05-03)

D5: WO 2005/081711 A (SEATTLE GENETICS INC [US]; DORONINA SVETLANA O [US]; SENTER PETER D [U) 9 September 2005 (2005-09-09)

D6: POLSON ANDREW G ET AL: "Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma." 15 July 2007 (2007-07-15), BLOOD 15 JUL 2007, VOL. 110, NR. 2, PAGE(S) 616 - 623 , XP002503252 ISSN: 0006-4971

5.2 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Claim 1 deals with an anti-CD79b antibody described by the CDRs regions and having different modifications in the CDRs. None of the cited documents describe such sequences in an antibody having this specificity. Claim 1 is considered as novel.

Independent claims 15,16,17,19,20,21,22 and 30 are also considered as new as far as they concern SEQ ID NO 10 and 14, which are novel.

On the contrary, independent claims 33 and 36 are not novel since the specificity is not indicated. Document D3 WO 01 71005, SEQ ID N0 13 is identical to SEQ ID N0 31 of the present application. The same applies for SEQ ID N0 14 and 47.

Independent claims 39 and 40 are novel, SED ID N0 12 and 16 are novel.

Independent claims 41 and 42 are also not novel since they refer back to claims that are not novel.

Independent claims 52-57 are also novel due to the novelty of SEQ ID N0 12 and 16.

Independent claims 58 is not novel since the interpretation of such a claim is so broad that any cell as a B lymphocyte producing an antibody against CD79b after a CD79b vaccination, falls under the scope of claim 58. Document D6 is such a document, from the authors of the present application.

All the independent claims 69,75,78,82,87,90,94,99,102,105-109,135,139,156,159,160,161,162,165,167 as far as they refer to a novel claim, are also considered as novel.

Finally independent claim 177 is also novel since SEQ ID N0 10 and 14 are also novel.

Document D1 is an interfering document relating to the 2F2 antibody, cited in the present application.

Document D2 is a document disclosing murine antibodies against CD79b. No humanized form envisaged not disclosed.

Document D4 gives a general teaching on the humanization process of an antibody.

Document D5 is a shopping list of antibodies among other against CD79b. Humanization of these antibodies are envisaged.

5.3 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

Document D2 is considered as the closest prior art.
The difference between D2 and the present application is that it deals with humanized anti-CD79b antibody.
The effect of this difference is a less immunogenic antibody.
The problem can therefore be defined as an improved anti-CD79b being less immunogenic.

The solution is defined by the sequences of the light and heavy chain chains of the humanized anti-CD79b (SEQ ID N0: 12 and 16). Thus none of the present claims give the solution to the underlying problem, since :
- an antibody can only be defined with the help of the light and heavy chains,
- it is not possible to allow any percentage of identity since, when looking at the example 1, page 202, it is clear that the change of only one amino acid can have a detrimental effect to the specificity and/or the affinity of the antibody.
- the FRs are also needed in the definition of the humanized antibody due to interaction shown in the example page 199, § 809, between the CDRs and the FRs.
- no functional definition of the humanized antibody will be allowed, only the specific humanized sequences of the light and heavy chains of the antibody 2F2.D7 are considered as involving an inventive step since the process of humanization is a well known process, as shown in document D4 WO 01/31065, and only the specific mutations shown are considered as involving an inventive step : starting from D2, it is not possible to arrive the present SEQ ID N0: 12 and 16 even when taking into the teaching of document D4 WO 01/31065. All the claims related to the inventive sequences are also considered as involving an inventive step.
But the current set of claims 1-177 does not involve an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT.

5.4 Independent claims 75,78,82,87,90,94160,162 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.
The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

Re Item VIII
Certain observations on the international application

8.1 The claims are drawn to an immunoglobulin molecule which binds specifically to CD79b antigen, wherein said immunoglobulin molecule comprises the sequences 12 and 16.

It is well established in the art that the formation of an intact antigen-binding site generally requires the association of the complete heavy and light chain variable regions of a given antibody, each of which consists of three CDRs which provide the majority of the contact residues for the binding of the antibody to its target epitope. The amino acid sequences and conformations of each of the heavy and light chain CDRs are critical in maintaining the antigen binding specificity and affinity which is characteristic of the parent immunoglobulin. It is expected that all of the heavy and light chain CDRs in their proper order and in the context of framework sequences which maintain their required conformation, are required in order to produce a protein having antigen-binding function and that proper association of heavy and light chain variable regions is required in order to form functional antigen binding sites. Even minor changes in the amino acid sequences of the heavy and light variable regions, particularly in the CDRs, may dramatically affect antigen-binding function as evidenced by Rudikoff et al (Proc Natl Acad Sd USA 1982 Vol 79 page 1979). Rudikoff et al. teach that the alteration of a single amino acid in the CDR of a phosphocholine-binding myeloma protein resulted in the loss of antigen-binding function. MacCallum et al. J. Mol. Biol. (1996) 262, 732-745, analysed many different antibodies for interactions with antigen and state that although CDR3 of the heavy and light chain dominate, a number of residues outside the standard CDR definitions make antigen contacts (see page 733, right col.) and non-contacting residues within the CDRs coincide with residues as important in defining canonical backbone conformations (see page 735, left col.). Pascalis et al. The Journal of Immunology (2002) 169, 3076-3084 demonstrate that grafting of the CDRs into a human framework was performed by grafting CDR residues and maintaining framework residues that were deemed essential for preserving the structural integrity of the antigen binding site (see page 3079, right col.). Although abbreviated CDR residues were used in the constructs, some residues in all 6 CDRs were used for the constructs (see page 3080, left col.). The fact that not just one CDR is essential for antigen binding or maintaining the conformation of the antigen binding site, is underscored by Casset et al. (2003) BBRC 307, 198-205, which constructed a peptide mimetic of an anti-CD4 monoclonal antibody binding site by rational design and the peptide was designed with 27 residues formed by residues from 5 CDRs (see entire document). Casset et al. also states that although CDR H3 is at the center of most if not all antigen interactions, clearly other CDRs play an important role in the recognition process (page 199, left col.) and this is demonstrated in this work by using all CDRs except L2 and additionally using a framework residue located just before the H3 (see page 202, left col.). Vajdos et al. (2002) 320, 415-428, additionally state that antigen

BJ

binding is primarily mediated by the CDRs more highly conserved framework segments which connect the CDRs are mainly involved in supporting the CDR loop conformations and in some cases framework residues also contact antigen (page 416, left col.). Holm et al. (2007) 44, 1075-1084 describes the mapping of an anti-cytokeratin antibody where although residues in the CDR3 of the heavy chain were involved in antigen binding unexpectedly a residue in CDR2 of the light chain was also involved (abstract). Chen et al. J. Mol. Bio. (1999) 293, 865-881 describe high affinity variant antibodies binding to VEGF wherein the results show that the antigen binding site is almost entirely composed of residues from heavy chain CDRs, CDR-H1, H2, H3 (page 866). Wu et al. J. Mol. Biol. (1999) 294, 151-162. state that it is difficult to predict which framework residues serve a critical role in maintaining affinity and specificity due in part to the large conformational change in antibodies that accompany antigen binding (page 152 left col.) but certain residues have been identified as important for maintaining conformation.
The references demonstrate that an antibody must comprise all 6 CDRs and 8 FRs in order to maintain the antigen binding specificity and affinity which is characteristic of the immunoglobulin.

8.2 Considering the percentage of amino acid identity, it is not allowable to claim percentage of identity other than 100% since the change of only 1 amino acid in the binding as well as in the framework regions can have detrimental effect on the binding capacity of the antibody. Therefore, claims dealing with percentage of identity are not allowable under Art. 5 and 6 PCT.

8.3 In addition, claim 1,41 and 42 are broadly drawn to an immunoglobulin comprising any combination of CDRs. The claims as written are drawn to an antibody comprising a heavy or light chain variable region with 3 CDR's of any combination of SEQ ID NOs listed. This would include chains comprising two CDRs regions and one CDR3 region or two CDR2 regions and one CDR3 region and the pairing of a heavy chain of one antibody to the light chain of another antibody. The specification does not provide support for the indefinite number of various combinations of the CDRs other than the combinations listed in SEQ ID NO: 12 and 16 which identify all 3 CDRs for each heavy and light chain variable region for each clone. Undue experimentation would be required in order to determine what combinations of the CDRs would result in a functional antibody.

8.4 Claim 1 does not meet the requirements of Article 5 PCT because the scope of these claims is such that the skilled person can only establish by the undue burden of experimentation and the use of inventive skill wether or not his particular choice from among the numerous possibilities falling under the wording :
- "the variant HVR comprises modification of at least one residue" will provide a satisfactory result.
The skilled person is not able to reproduce all embodiment falling under the scope of claim 1 since an enabling disclosure relating to said subject-matter is partially lacking within the application.
Consequently claim 1 does not meet the requirements of articles 5 and 6 PCT.
Sufficient support and disclosure was found in the examples for sequences coding the 2F2.D7.

8.5 Claims 16,20 are drafted in a so-called "reach-through claim" since the Applicant attempts to obtain protection for something which has not yet been invented i.e. " a humanized anti-CD79b wherein the mono or bivalent affinity of the antibody to human CD79b is at least 1,2 or 3-fold greater than the affinity of the a murine or chimeric antibody in its bivalent/monovalent form". Claim 16,20 are not allowable under Art. 5 and 6 PCT.

8.6 The term "2F2" of claim 30 is meaningless and does not refer to any specific sequences. This internal designation should be used in connection with sequences or other technical features.

8.7 The claims must not refer back to the figures 7 and 8 and 13. The claims should be self content.

8.8 Claims 55,59,60,65,68,69,71,75,78,82,87,90,99,102,105,109,123,125 refer back to claim 177, which is not possible. Corrections should be made accordingly.

8.9 In a later European regional phase objections might be raised against any expression within the description such as "...incorporated by reference..." as the regional patent law requires that the application is self-contained.

8.10 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in D1-D6 would not appear to be mentioned /discussed in the description, nor

are these documents identified therein.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se centra en composiciones de sustancias útiles para el tratamiento de tumor hematopoyético en mamíferos, así como los métodos para usar dichas composiciones de sustancias con el mismo objetivo.

91

PATENTE
Expediente de Genentech n.°P5112R1

ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES AFINES

[0001] En esta solicitud no provisional, presentada al amparo del artículo §1.53(b) del Código de Regulaciones Federales (CFR) 37, se reivindica el beneficio contemplado en el artículo §119(e) del Código de Estados Unidos USC) 35 de la solicitud provisional de patente de EE.UU. con número de serie 60/950.088, presentada el 16 de julio de 2007, la cual se incorpora en su totalidad a modo de referencia.

ÁMBITO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se centra en composiciones de sustancias útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en mamíferos, así como los métodos para usar dichas composiciones de sustancias con el mismo objetivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en Estados Unidos, después de la enfermedad cardiaca (Boring y col., *CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993)). El cáncer se caracteriza por el aumento de la cantidad de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión por parte de estas células tumorales neoplásicas de los tejidos adyacentes y la producción de células malignas que finalmente se distribuyen a través de la sangre o el sistema linfático hacia llegar a ganglios linfáticos regionales y sitios distantes mediante un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera en condiciones en las que las células normales no crecerían. El cáncer se manifiesta de diversas maneras y se caracteriza por diferentes grados de capacidad de invasión y agresividad.

[0004] Los cánceres que involucran a las células generadas durante la hematopoyesis, un proceso por el cual se generan los elementos celulares de la sangre, como linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células asesinas naturales, se les llama cánceres hematopoyéticos. Los linfocitos que pueden ser hallados en la sangre y en el tejido linfático y que son cruciales para la respuesta inmune se clasifican en dos clases principales de linfocitos: Linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T), que median la inmunidad humoral y mediada por células, respectivamente.

[0005] Las células B maduran en la médula ósea y la abandonan expresando un anticuerpo de unión al antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B virgen se encuentra por primera vez con el antígeno para el cual su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula comienza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras, llamadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen mayor duración y siguen expresando el anticuerpo unido a

92

la membrana con la misma especificidad que la célula progenitora original. Las células plasmáticas no producen un anticuerpo unido a la membrana, sino un anticuerpo en forma secretada. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

[0006] Los trastornos relacionados con las células B incluyen, pero no se limitan a, linfoma maligno (linfoma no de Hodgkin, LNH), mieloma múltiple (MM) y leucemia linfocítica crónica (LLC, leucemia de células B (linfocitos B CD5+)). Los linfomas de no Hodgkin (LNH), un grupo heterogéneo de cánceres que generan principalmente los linfocitos B, representan aproximadamente un 4% de todos los cánceres diagnosticados recientemente (Jemal, A. y col., CA-Cancer J Clin., 52: 23-47 (2002)). El LNH agresivo comprende aproximadamente del 30 al 40% de LNH en adultos (Harris, N. L. y col., Hematol. J., 1:53-66 (2001)) e incluye el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), linfoma de células del manto (LCM), linfoma periférico de células T y linfoma anaplásico de células grandes. La quimioterapia de combinación de primera línea cura a menos de la mitad de los pacientes con LNH agresivo y la mayoría de éstos sucumben eventualmente a su enfermedad (Fischer, R.I., Semin. Oncol., 27 (suppl 12): 2-8 (2000)).

[0007] Las células T maduran en el timo, el cual provee un ambiente para la proliferación y la diferenciación de las células T inmaduras. Durante la maduración de las células T, éstas experimentan un reordenación de genes que produce el receptor de células T y la selección positiva y negativa que ayuda a determinar el fenotipo de la superficie celular de la célula T madura. El complejo CD3 de células T receptoras y uno de los correceptores, CD4 o CD8, son los marcadores de superficie celular de células T maduras.

[0008] En intentos por descubrir objetivos celulares eficaces para la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana, u otros polipéptidos asociados de otra manera a la membrana, que se expresen específicamente en la superficie de una o más clases particulares de células cancerosas en comparación con los expresados en una o más células normales no cancerosas. A menudo, estos polipéptidos asociados a la membrana se expresan con mayor abundancia en la superficie de las células cancerosas en comparación con los expresados en la superficie de las células no cancerosas. La identificación de estos polipéptidos antígenos asociados al tumor que se expresan en la superficie celular ha dado pie a la capacidad de atacar de forma específica células cancerosas para destruirlas a través de terapias basadas en anticuerpos. A este respecto, cabe destacar que la terapia basada en anticuerpos ha resultado muy eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado con éxito para el tratamiento del cáncer de mama y del linfoma no Hodgkin, respectivamente. Más concretamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En el 25-30% de los cánceres primarios de mama se observa una sobreexpresión de la proteína del HER2. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/murino creado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra

en la superficie de linfocitos B malignos y normales. Estos dos anticuerpos se producen de forma recombinante en células CHO.

[0009] En otros intentos por descubrir objetivos celulares eficaces para la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar (1) polipéptidos no asociados a la membrana que produzcan específicamente una o más clases en particular de células cancerosas en comparación con los producidos por una o más clases en particular de células normales no cancerosas, (2) polipéptidos que son producidos por células cancerosas a un nivel de expresión significativamente mayor que el observado en una o más células normales no cancerosas, o (3) polipéptidos cuya expresión se limite específicamente a una única clase de tejido (o una cantidad muy limitada de éstas) en estado tanto canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido prostático normal y tumoral). Dichos polipéptidos pueden permanecer ubicados en zona intracelular, o la célula cancerosa puede segregarlos. Además, puede que la célula cancerosa en sí no exprese estos polipéptidos sino que lo hagan células que produzcan y/o segreguen polipéptidos que potencien o mejoren el crecimiento de las células cancerosas. Estos polipéptidos segregados son a menudo proteínas que ofrecen a las células cancerosas una ventaja en términos de crecimiento con respecto a las células normales, e incluyen elementos como, por ejemplo, factores angiogénicos, de adhesión celular, crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de antagonistas de tales polipéptidos no asociados a la membrana sirviese como agente terapéutico eficaz para el tratamiento de estas clases de cáncer. Además, la identificación del modelo de expresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

[0010] A pesar de los adelantos anteriormente identificados en la terapia del cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de agentes terapéuticos capaces de detectar la presencia de un tumor en un mamífero e inhibir con eficacia el crecimiento de las células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, es el objetivo de la presente invención identificar polipéptidos asociados a la membrana celular, secretados o intracelulares, cuya expresión esté específicamente limitada a una única clase de tejido (o una cantidad muy limitada de estas), tejidos hematopoyéticos, tanto en estado canceroso como no canceroso y usar esos polipéptidos y sus ácidos nucleicos codificados para producir composiciones de sustancias útiles para el tratamiento terapéutico o para la detección de cáncer hematopoyético en mamíferos.

[0011] CD79 es el componente de señal del receptor de la célula B y consiste en un heterodímero covalente que contiene CD79a (Igα, mb-1) y CD79b (Igβ, B29). Tanto CD79a como CD79b contienen cada una un dominio de inmunoglobulina (Ig) extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señal intracelular, un dominio de motivo promotor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). CD79 se expresa en las células B y el células de linfoma no de Hodgkin (LNH) (Cabezudo y col., *Haematologica,* 84:413-418 (1999); D'Arena y col., *Am. J. Hematol.,* 64: 275-281 (2000); Olejniczak y col., *Immunol. Invest.,* 35: 93-114 (2006)). Tanto CD79a como CD79b y sIg se requieren para la expresión de superficie de CD79 (Matsuuchi y col., *Curr. Opin. Immunol.,* 13(3): 270-7)). La expresión de superficie promedio de CD79b en LNH es similar a la expresión sobre las células B normales, pero con un rango más amplio (Matsuuchi y col., *Curr. Opin. Immunol.,* 13(3): 270-7 (2001)).

[0012] Dada la expreción de CD79b, es provechoso producir anticuerpos terapéuticos al antígeno CD79b que produzcan poca o ninguna antigenicidad cuando se administran a pacientes, especialmente para tratamiento crónico. La presente invención satisface esta y otras necesidades. La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que superan las limitaciones de las actuales composiciones terapéuticas, además de ofrecer ventajas adicionales que serán evidentes en la descripción detallada que se suministra más adelante.

[0013] El uso de conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), o sea, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citostáticos o citotóxicos, es decir, fármacos para destruir o inhibir a las células tumorales en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005), Curr. Opinion in Pharmacology, 5:543-549, Wu y col., (2005), Nature Biotechnology, 23(9):1137-1146, Payne, G. (2003), Cancer Cell, 3:207-212, Syrigos y Epenetos (1999), Anticancer Research, 19:605-614, Niculescu-Duvaz y Springer (1997), Adv. Drug Del. Rev., 26: 151-172 y la patente de EE.UU. n.º 4975278) permite administrar una porción del fármaco para que actúe directamente contra tumores, y la acumulación intracelular que en ellos se produce, pudiendo la administración sistemática de estos agentes farmacéuticos no conjugados dar como resultado niveles de toxicidad inaceptables tanto para las células normales como las tumorales que se pretenda eliminar (Baldwin y col., (1986), Lancet, páginas (15 de marzo de 1986):603-05 y Thorpe, (1985), "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera y col., editores, páginas 475-506). Los esfuerzos para mejorar el índice terapéutico, es decir, la eficacia máxima y la toxicidad mínima de los ADC, se han centrado en la selectividad de los anticuerpos policlonales (Rowland y col., (1986), Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87) y monoclonales (mAb), así como las propiedades para liberar y enlazarse con fármacos (Lambert, J. (2005), Curr. Opinion in Pharmacology, 5:543-549). Entre las porciones de fármacos empleadas en conjugados de anticuerpos y fármacos se incluyen las toxinas proteínicas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas proteínicas vegetales como la ricina, moléculas pequeñas como auristatinas, geldanamicina (Mandler y col., (2000), J. of the Nat. Cancer Inst., 92(19):1573-1581, Mandler y col., (2000), Bioorganic & Med. Chem. Letters, 10:1025-1028 y Mandler y col., (2002), Bioconjugate Chem., 13:786-791), maitansinoides (patente europea n.º 1391213, Liu y col., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623), calicheamicina (Lode y col., (1998), Cancer Res., 58:2928; Hinman y col., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), daunomicina, dozorrubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986) *citado anteriormente*). Las porciones de fármaco pueden afectar a los mecanismos citotóxicos y citostáticos, incluyendo la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

[0014] Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina (WO 02/088172), han sido conjugados como fracciones de fármacos a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en tumores hematológicos (Klussman, y col., (2004), Bioconjugate Chemistry

95

15(4):765-773; Doronina y col., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco y col., (2003) Blood 102(4):1458-1465; patente de EE.UU. N.º 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tal como rituxan (documento WO 04/032828) para el tratamiento de células tumorales que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos 2H9 anti-EphB2 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao, y col., (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar y col., (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); (vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, patente de EE.UU. No. 2005/0238649) y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). Las variantes de auristatina E se divulgan en las patentes de EE.UU. Nos. 5767237 y 6124431. La monometilauristatina E conjugada a anticuerpos monoclonales se divulga en Senter y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, resumen número 623, presentada el 28 de marzo de 2004. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado con varios anticuerpos (Patente de EE.UU. No. 2005/0238649).

[0015] Los medios convencionales de unión, o sea de unión a través de enlaces covalentes, de una fracción de fármaco a un anticuerpo generalmente dan lugar a una mezcla heterogénea de moléculas donde las fracciones de fármaco se unen al anticuerpo en una serie de sitios. Por ejemplo, los medicamentos citotóxicos se han conjugado normalmente con anticuerpos a través de los residuos de lisina, con frecuencia abundantes, de un anticuerpo, generando una mezcla de conjugado de anticuerpo y fármaco. Según las condiciones de la reacción, la mezcla heterogénea generalmente contiene una distribución de anticuerpos que tienen unidas de 0 a aproximadamente 8, o más, porciones de fármaco. Además, dentro de cada subgrupo de conjugados con una proporción determinada de números enteros de porciones de fármaco y anticuerpos, la mezcla es potencialmente heterogénea cuando la porción de fármaco se une al anticuerpo en varios sitios. Los métodos analíticos y de preparación pueden ser inadecuados para separar y caracterizar a las moléculas de especies de conjugados de anticuerpos y fármacos dentro de la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son biomoléculas de gran tamaño, complejas y estructuralmente diversas, a menudo con muchos grupos funcionales reactivos. Sus niveles de reacción con los reactivos enlazadores y los intermediarios fármaco-enlazador dependen de factores como el pH, la concentración, la concentración de sal y los cosolventes. Además, el proceso de conjugación de pasos múltiples puede ser no reproducible debido a las dificultades para controlar las condiciones de reacción y caracterizar a los reactivos y los intermediarios.

[0016] Los tioles de cisteína son reactivos a un pH neutro, a diferencia de la mayoría de las aminas, que son protonadas y menos nucleófilas con un pH cercano a 7. Puesto que los grupos tiol libres (RSH, sulfhidrilo) son relativamente reactivos, las proteínas con residuos de cisteína suelen existir en su forma oxidada como oligómeros con enlace disulfuro o tienen grupos con puentes bisulfuro internos. Las proteínas extracelulares generalmente no tienen tioles libres (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres, en la página 55). Los grupos de anticuerpos tiol cisteína generalmente son más reactivos, o sea, más nucleófilos, con relación a los reactivos de conjugación electrófilos que los grupos de anticuerpos amino o hidroxilo. Los residuos de cisteína se han introducido en proteínas mediante técnicas de ingeniería genética para formar uniones covalentes a ligandos o nuevos

enlaces bisulfuro intramoleculares (Better y col., (1994), J. Biol. Chem., 13:9644-9650, Bernhard y col., (1994), Bioconjugate Chem., 5:126-132, Greenwood y col., (1994), Therapeutic Immunology, 1:247-255, Tu y col., (1999), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 96:4862-4867, Kanno y col., (2000), J. of Biotechnology, 76:207-214, Chmura y col., (2001), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 98(15):8480-8484 y la patente de EE.UU. n.º 6248564). Sin embargo, la ingeniería en grupos tiol cisteína mediante la mutación de diversos residuos aminoacídicos de una proteína en aminoácidos de cisteína es potencialmente problemática, en particular en el caso de residuos independientes (cisteína libre) o aquellos relativamente accesibles para reacción u oxidación. En soluciones concentradas de la proteína, ya sea en el periplasma de E. coli, sobrenadantes de cultivo, o proteína parcial o completamente purificada, los residuos de cisteína independientes en la superficie de la proteína pueden emparejarse y oxidarse para formar bisulfuros intermoleculares y, por tanto, dímeros o multímeros de proteínas. La formación de dímeros bisulfuro hace que la nueva cisteína no sea reactiva para la conjugación con un fármaco, ligando u otro marcador. Asimismo, si la proteína forma por oxidación un enlace bisulfuro intramolecular entre la cisteína recientemente diseñada y un residuo de cisteína existente, ambos grupos tiol cisteína no están disponibles para participar e interactuar en un sitio activo. Además, la proteína puede volverse inactiva o no específica, por plegado incorrecto o pérdida de estructura terciaria (Zhang y col. (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

[0017] Los anticuerpos diseñados con cisteína han sido diseñados como fragmentos de anticuerpos FAB (thioFab) y expresados como anticuerpos monoclonales IgG de longitud completa (thioMab) (Junutula, J.R. y col. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; patente de los EE.UU. No. 2007/0092940, el contenido de la cual está incorporado por referencia). Los anticuerpos ThioFab y ThioMab han sido conjugados a través de enlazadores en los tioles cisteína recientemente introducidos con reactivos enlazadores tiol específicos y reactivos enlazadores con fármacos para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco (Thio ADC).

[0018] Todas las referencias citadas en la misma, incluidas las solicitudes de patentes y publicaciones, quedan incorporadas a modo de referencia únicamente.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0019] La invención proporciona anticuerpos anti-CD79b o fragmentos funcionales de los mismos y su método de uso en el tratamiento de tumores hematopoyéticos.

[0020] En otro aspecto, la invención ofrece un anticuerpo que se une, preferentemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, incluyendo Fab, Fab', $F(ab')_2$ y un fragmento Fv, diacuerpo, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhibe completamente la unión de un anticuerpo anti-CD79b polipéptido a su respectivo epítopo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un maitansinoide, un derivado de la dolostatina o una

caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas y, preferentemente, inducir la muerte de una célula a la que se unen. Con fines de detección, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

[0021] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en donde la afinidad monovalente (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento Fab a CD79b) o afinidad en su forma bivalente al anticuerpo CD79b (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento IgG a CD79b) es sustancialmente la misma que, menor que o mayor que la afinidad monovalente o afinidad en su forma bivalente, respectivamente, de un anticuerpo murino (p. ej. afinidad del anticuerpo murino como un fragmento Fab o como un fragmento IgG a CD79b) o un anticuerpo quimérico (p. ej. afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab o como un fragmento IgG a CD79b), que incluye, consiste o consiste esencialmente en una cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, como se muestra en la Figura 7 (identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0022] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b humanizado, en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a CD79b (p. ej., afinidad del anticuerpo como una IgG a CD79b) es 2.0 nM.

[0023] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD79b, en donde el anticuerpo comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.°: 59)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.°: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.°: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.°: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNQKFKD (identificador de secuencia n.°: 63) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F10 es ARNLYL (identificador de secuencia n.°: 64).

[0024] En un aspecto, se provee un anticuerpo que se une a CD79b, en donde el anticuerpo comprende por lo menos una variante HVR, en donde la secuencia de la variante HVR comprende la modificación de por lo menos un residuo de la secuencia mostrada en los identificadores de secuencia n.°: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64.

98

[0025] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, que incluye la secuencia de la HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC que se muestra en la Figura 13 (identificadores de secuencia n.º: 31-33).

[0026] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de la HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC mostrada en la Figura 13 (identificadores de secuencia n.º: 23-25).

[0027] En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio variable de cadena pesada del identificador de secuencia n.º: 16. En otro aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio variable de cadena ligera del identificador de secuencia n.º: 12.

[0028] En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres y una secuencia seleccionada de los identificadores de secuencias n.º: 91-122. El anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína puede unirse a un polipéptido CD79b. El anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína puede prepararse mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b progenitor por cisteína.

[0029] En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína, que comprende uno o más amino ácidos de cisteína libres, en donde el anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína se une a un polipéptido CD79b y se prepara mediante un proceso que incluye reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b progenitor con cisterna en donde el anticuerpo progenitor incluye a por lo menos una secuencia de la secuencia HVR seleccionada de:

(a) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º: 59);

(b) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60);

(c) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61) o FQGTHFPFT (identificador de secuencia n.º: 79);

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62);

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (identificador de secuencia n.º: 63); y

(f) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F10 es ARNLYL (identificador de secuencia n.º: 64).

[0030] El anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhiba competitivamente la unión del anticuerpo polipéptido anti-CD79b a su correspondiente epítopo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse

opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o con un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo una auristatina o un maitansinoide. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas y, preferentemente, inhiben el crecimiento o la proliferación, o bien inducen la muerte, de una célula a la que se unen. Con fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

[0031] En un aspecto, la invención proporciona métodos para elaborar un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método para la elaboración de un anticuerpo anti-CD79b (que, según se define en la presente memoria descriptiva, incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de estos), consistiendo dicho método en la expresión en una célula huésped idónea de un vector recombinante de la invención que codifique dicho anticuerpo (o un fragmento del mismo) y en la recuperación de dicho anticuerpo.

[0032] En un aspecto, la invención es una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención o un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención y un diluyente, una molécula vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0033] En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase; y una composición contenida dentro del envase, en el que la composición incluye uno o más anticuerpos CD79b de la invención.

[0034] En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que contiene una composición que incluye uno o más anticuerpos CD79b de la invención; y un segundo envase que comprende una solución tamponada.

[0035] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo CD79b de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, como cáncer, un tumor o un trastorno de proliferación celular.

[0036] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo fabricado de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, como cáncer, un tumor o un trastorno de proliferación celular.

[0037] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, como cáncer, un tumor o un trastorno de proliferación celular.

[0038] En un aspecto, la invención proporciona un método para la inhibición del crecimiento de un célula que expresa el CD79b, el cual comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la invención, lo que origina la inhibición del crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0039] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar terapéuticamente a un mamífero que tiene un tumor canceroso que incluye una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención a

120

dicho mamífero, tratando así efectivamente a dicho mamífero. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0040] En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión de CD79b. Dicho método comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención a un sujeto que necesite dicho tratamiento, lo que permite tratar o prevenir eficazmente dicho trastorno de proliferación celular. En una realización, dicho trastorno de proliferación es cáncer. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0041] En una aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula, donde el crecimiento de dicha célula depende por lo menos en parte de un efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método el contacto de la célula mencionada con una cantidad efectiva de anticuerpo de la invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0042] En una aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor depende por lo menos en parte de un efecto potenciador del crecimiento de CD79b, comprendiendo dicho método el contacto de la célula mencionada con una cantidad efectiva de anticuerpo de la invención, tratando así efectivamente a dicho tumor. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0043] En un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración a un paciente de la formulación farmacéutica, que incluye un inmunoconjugado descrito en la presente memoria descriptiva, un diluyente, una molécula vehículo o un excipiente aceptable.

[0044] En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir la proliferación de células B, que comprende la exposición de una célula a un inmunoconjugado que incluye un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan la unión del inmunoconjugado a CD79b.

[0045] En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia de CD79b en una muestra sospechosa de contener CD79b, comprendiendo dicho método la exposición de la muestra a un anticuerpo de la invención y determinando la unión del anticuerpo a CD79b en dicha muestra, en donde la unión del anticuerpo a CD79b en dicha muestra es indicación de la presencia de dicha proteína en la misma.

[0046] En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de células, tales como las células B, que expresan CD79b. Este método comprende establecer un contacto entre células de prueba en una muestra biológica con cualquiera

101

de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de unión del anticuerpo a células de prueba en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD79b y comparar el nivel de unión del anticuerpo a las células en una muestra de células de control, donde el nivel de unión del anticuerpo se normaliza a la cantidad de células que expresan CD79b en las muestras de células de prueba y de control, y en donde el nivel más elevado de unión del anticuerpo en la muestra de células de prueba comparado con la muestra de células de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a células que expresan CD79b.

[0047] En un aspecto, la invención proporciona un método de detección de CD79b soluble en la sangre o en el suero. Este método comprende establecer el contacto entre una muestra de prueba de sangre o de suero de un mamífero que se cree que experimenta un trastorno proliferativo de células B con un anticuerpo anti-CD79b de la invención y detectar un aumento en el CD79b soluble en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control de sangre o de suero de un mamífero normal.

[0048] En un aspecto, la invención proporciona un método para unir un anticuerpo de la invención a una célula que expresa CD79b, comprendiendo dicho método en establecer contacto de dicha célula con un anticuerpo de la invención. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0049] La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (identificación de secuencia n.°: 1) de un PRO36249 ADNc, en donde la identificación de secuencia n.°: 1 es un clon designado en la presente memoria descriptiva como "DNA225786" (también denominado en la presente como "CD79b"). La secuencia de nucleótidos codifica para CD79b con los codones iniciales y finales mostrados en negritas y subrayados.

[0050] La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácido (identificador de secuencia n.°: 2) derivada de la secuencia de codificación del identificador de secuencia n.°: 1, mostrado en la Figura 1.

[0051] La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótido (identificador de secuencia n.°: 3) de la cadena ligera de 2F2 (ch2F2) IgG1 quimérica (2F2 es un anticuerpo monoclonal anti-CD79b murino). La secuencia nucleótida codifica para la cadena ligera de ch2F2 mostrada en la Figura 4, con el primer codón (que codifica el primer aminoácido del identificador de secuencia n.°: 4) mostrado en negritas y subrayado.

[0052] La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácido (identificador de secuencia n.°: 4) derivada de la secuencia de codificación del identificador de secuencia n.°: 3, mostrada en la Figura 3. Las regiones variables son las regiones no subrayadas.

[0053] La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótido (identificador de secuencia n.°: 5) de la cadena pesada de 2F2 (ch2F2) IgG1 quimérica (2F2 es un anticuerpo monoclonal anti-CD79b murino). La secuencia nucleótida codifica para la cadena pesada de ch2F2 mostrada en la Figura 6, con el primer codón (que codifica el primer aminoácido del identificador de secuencia n.°: 6) mostrado en negritas y subrayado.

102

[0054] La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácido (identificador de secuencia n.º: 6) derivada de la secuencia de codificación del identificador de secuencia n.º: 5, mostrada en la Figura 5. Las regiones variables son las regiones no subrayadas.

[0055] La Figura 7 muestra la alineación de secuencias de las cadenas ligeras variables para los siguientes: secuencia consenso de la cadena ligera kappa I humana (marcada como "huKI"; identificador de secuencia n.º: 9) con VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (identificadores de secuencia n.º: 65-68, respectivamente), anticuerpo anti-CD79b 2F2 murino (marcado como "mu2F2" y también denominado en la presente memoria descriptiva como "2F2"; identificador de secuencia n.º: 10), anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 (marcado como "injerto hu2F2"; identificador de secuencia n.º: 11) y anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 variante 7 (marcado como "hu2F2.D7"; identificador de secuencia n.º: 12) (contiene 71A, 73T y 78A). Las posiciones están numeradas de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables (HVR) injertadas de 2F2 murino a la estructura de consenso Kappa I variable ligera se encuentran en recuadros.

[0056] Las Figuras 8A-B muestran la alineación de secuencias de las cadenas pesadas variables para los siguientes: secuencia consenso de la cadena pesada subgrupo III humana (marcada como "humIII"; identificador de secuencia n.º: 13) con VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3, VH-FR4 (identificadores de secuencia n.º: 69-72, respectivamente), anticuerpo anti-CD79b 2F2 murino (marcado como "mu2F2" y también denominado en la presente memoria descriptiva como "2F2"; identificador de secuencia n.º: 14), anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 (marcado como "injerto hu2F2"; identificador de secuencia n.º: 15) (contiene 71A, 73T y 78A) y anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 variante 7 (marcado como "hu2F2.D7"; identificador de secuencia n.º: 16) (contiene 71A, 73T y 78A). Las posiciones están numeradas de acuerdo con Kabat y las regiones hipervariables (HVR) injertadas de mu2F2 murino a la estructura de consenso del subgrupo III variable pesada se encuentran en recuadros.

[0057] La Figura 9 muestra la secuencia HVR de una variante seleccionada de anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 (identificador de secuencia n.º: 18), en donde la variante tiene cambios múltiples de aminoácidos en una sola región HVR del anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 (porción de HVR-L3 (identificador de secuencia n.º: 61) se muestra en la Figura 9 como identificador de secuencia n.º: 17). Las secuencias de las cadenas ligeras variables y pesadas variables fuera de los cambios de aminoácidos mostrados fueron idénticas a las de los injertos a 2F2 y no se muestran. No se observaron cambios en HVR-L1 (identificador de secuencia n.º: 59), HVR-L2 (identificador de secuencia n.º: 60), HVR-H1 (identificador de secuencia n.º: 62), HVR-H2 (identificador de secuencia n.º: 63) o HVR-H3 (identificador de secuencia n.º: 64) del anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2.

[0058] La Figura 10 muestra el análisis Biacore de anticuerpos anti-CD79b seleccionados, incluyendo anticuerpo ch2F2 (marcado como "ch2F2"), anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 (marcado como "injerto hu2F2" y también denominado en la presente memoria descriptiva como "injerto 2F2") y anticuerpo "humanizado" injertado a 2F2 variante 7 (hu2F2.D7) (89F, 96F; identificador de secuencia n.º: 18) a antígenos designados, incluyendo el dominio extracelular de CD79b humano ($huCD79b_{ecd}$), el

dominio extracelular de CD79b humano fusionado a Fc (huCD79b$_{ecd}$-Fc) y un péptido de 16 aminoácidos que contiene el epítopo de 2F2 (16mer péptido; indicador de secuencia n.º: 78; epítopo en los aminoácidos 1-11 del identificador de secuencia n.º: 78). Las uniones no detectadas se designan como "NB" en la figura.

[0059] Las Figuras 11A-B (estructuras de consenso variables pesadas (VH)) y 12 (estructuras de consenso variables ligeras (VL)) muestran ejemplos de secuencias de estructuras de consenso humano del aceptor para ser usadas al practicar la presente invención con los identificadores de secuencia como sigue: (Figura 11A-B) Estructura de consenso del subgrupo I humano VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia n.º: 36), estructura de consenso del subgrupo I humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 37-39), estructura de consenso del subgrupo II humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 40), estructura de consenso del subgrupo II humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 41-43), estructura de consenso del subgrupo III humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 44), estructura de consenso del subgrupo III humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 45-47), estructura del aceptor humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 48), estructura del aceptor humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 49-50), estructura del aceptor 2 humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 51) y estructura del aceptor 2 humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 52-54) y (Figura 12) estructura de consenso del subgrupo I humano kappa VL (identificador de secuencia n.º: 55), estructura de consenso del subgrupo II humano kappa VL (identificador de secuencia n.º: 56), estructura de consenso del subgrupo III humano kappa (identificador de secuencia n.º: 57) y estructura de consenso del subgrupo IV humano kappa (identificador de secuencia n.º: 58).

[0060] Las Figuras 13A (cadena ligera) y 13B (cadena pesada) muestra la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la invención (2F2.D7). Las Figuras 13A (cadena ligera) y 13B (cadena pesada muestras las secuencias de aminoácidos de la estructura (FR), de la región hipervariable (HVR), del primer dominio constante (CL o CH1) y de la región Fc (Fc) de una realización de un anticuerpo de la invención (hu2F2.D7) (identificadores de secuencia n.º: 19-26 (Figura 13A) e identificadores de secuencia n.º: 27-35 (Figura 13B)). Las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variables y constantes) de las cadenas ligeras y pesadas de 2F2.D7 se muestran en (identificadores de secuencia n.º: 89 (Figura 13A) y 90 (Figura 13B), respectivamente, con los dominios constantes subrayados. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables se muestran en (identificador de secuencia n.º: 12 (Figura 13A para cadena ligera) e identificador de secuencia n.º: 16 (Figura 13B para cadena pesada)).

[0061] La Figura 14 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de CD79b de humano (identificador de secuencia n.º: 2), de mono cynomolgus (cyno) (identificador de secuencia n.º: 7) y de ratón (identificador de secuencia n.º: 8). El CD79b de humano y de cyno tienen 95% de homología de aminoácidos. La secuencia de señal, los péptidos de prueba (el epítopo de 11 aminoácidos del anticuerpo 2F2 descrito en el Ejemplo 1; aminoácidos 1-11 (APSEDRYPNPK) del identificador de secuencia n.º: 78),

se muestran el dominio transmembrana (TM) y el dominio de motivo promotor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). La región en caja es la región de CD79b que está ausente en la variante de ayuste de CD79b (descrita en el Ejemplo 1).

[0062] La Figura 15 muestra las representaciones de los conjugados de anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína (ADC) y fármacos, donde una porción del fármaco se une a un grupo diseñado con cisteína en: la cadena ligera (LC-ADC), la cadena pesada (HC-ADC) y la región Fc (Fc-ADC).

[0063] La Figure 16 muestra los pasos de: (i) reducir los aductos de bisulfuros de cisteína, las intercadenas y los bisulfuros de las intercadenas en un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína (ThioMab) con un agente TCEP reductor (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloruro); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidar para reformar la intercadena y los bisulfuros de intercadenas con dhAA (ácido dehidroascórbico); y (iii) lograr la conjugación del anticuerpo reoxidado con un enlazador a fármaco intermedio para formar un conjugado de anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína con fármacos (ADC).

[0064] La Figura 17 muestra (A) la secuencia de cadena ligera (identificador de secuencia n.°: 86) y (B) de la cadena pesada (identificador de secuencia n.°: 85) del anticuerpo anti-CD79b humanizado diseñado con cisteína (thio-hu2F2.D7-HC-A118C), en el cual una alanina en la posición EU 118 (posición secuencial de alanina 118; posición Kabat 114) de la cadena pesada fue alterado a una cisteína. Una porción del fármaco puede ser agregada al grupo diseñado con cisteína en la cadena pesada. En cada figura, el aminoácido modificado se muestra en un texto en negrita con doble subrayado. Los subrayados simples indican regiones constantes. Las regiones variables no están subrayadas. La región Fc está marcada con cursivas. "Thio" se refiere a un anticuerpo diseñado con cisteína mientras que "hu" se refiere a un anticuerpo humanizado.

[0065] La Figura 18 muestra (A) la secuencia de cadena ligera (identificador de secuencia n.°: 88) y (B) de la cadena pesada (identificador de secuencia n.°: 87) de un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína (Thio-hu2F2.D7-LC-V205C),en el cual una valina en la posición Kabat 205 (posición secuencial de valina 210) de la cadena ligera fue modificada a cisteína. El aminoácido D en la posición EU 6 (sombreado en la Figura) de la cadena pesada puede ser E alternativamente. Una porción del fármaco añadida al grupo diseñado con cisteína en la cadena pesada. En cada figura, el aminoácido modificado se muestra en un texto en negrita con doble subrayado. Los subrayados simples indican regiones constantes. Las regiones variables no están subrayadas. La región Fc está marcada con cursivas. "Thio" se refiere a una anticuerpo diseñado con cisteína.

[0066] La Figura 19 es un gráfico de inhibición del crecimiento en vivo de un tumor en un modelo de xenotrasplante de BJAB-luciferasa que muestra que la administración de anticuerpos anti-CD79b ((a) ch2F2-SMCC-DM1, la concentración del fármaco fue de aproximadamente 3 (Tabla 7) y (b) hu2F2.D7-SMCC-DM1, la concentración del fármaco fue de aproximadamente 2.3 (Tabla 7)) a ratones SCID con tumores de células B humanas inhibió significativamente el crecimiento del tumor. Los controles incluyeron HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). "Hu" se refiere a un anticuerpo humanizado y "ch" a un anticuerpo quimérico.

[0067] La figura 20A es una gráfica de la inhibición del crecimiento en vivo en Granta-519 (Linfoma de las células del manto humano) en un modelo de xenotrasplante, el cual muestra que la administración de un anticuerpo anti-CD79b, hu2F2.D7-SMCC-DM1, siendo la concentración del fármaco de aproximadamente 2.8 (Tabla 8), a ratones SCID con un tumor de células B humanas inhibió significativamente el crecimiento del tumor. Los controles incluyeron HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). La Figura 20B es un diagrama sobre el porcentaje de cambios de peso en los ratones utilizados en el estudio del xenotransplante Granta-519 (Figura 20A y Tabla 8), que muestra que no se produjo ningún cambio de peso significativo durante los primeros 7 días del estudio. "Hu" se refiere a un anticuerpo humanizado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

[0068] La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar composiciones útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en mamíferos y métodos para usar esas composiciones de importancia para lo mismo.

[0069] En la presente memoria descriptiva, se proporciona información sobre estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación.

I. Técnicas Generales

[0070] La práctica de la presente invención empleará, salvo indicación en contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la técnica conocida. Estas técnicas se explican completamente en la literatura sobre la materia, como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas y col., 2001).

II. Definiciones

[0071] Para los propósitos de interpretación de esta especificación, aplican las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición publicada esté en conflicto con cualquier documento incorporado en la presente memoria descriptiva a modo de referencia, la definición publicada es la que domina.

[0072] En la presente memoria descriptiva, un "marcador de la superficie de células B" o "antígeno de la superficie de células B" es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula B que puede actuar con un antagonista que se une a él, incluyendo, entre otros, anticuerpos a un antígeno de la

superficie de las células B o un antígeno de la superficie de las células B en forma soluble capaz de unir antagonistas de un ligando a un antígeno de las células B que se produzca naturalmente. Entre los marcadores ejemplares de la superficie de células B se encuentran los marcadores de la superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para conocer sus descripciones, consulte The Leukocyte Antigen Facts Book, 2ª edición, 1997, ed. Barclay y col., Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de la superficie de células B incluyen el RP105, el FcRH2, el CR2 de células B, el CCR6, el P2X5, el HLA-DOB, el CXCR5, el FCER2, el BR3, el BAFF, el BlyS, el Btig, el NAG14, el SLGC16270, el FcRH1, el IRTA2, el ATWD578, el FcRH3, el IRTA1, el FcRH6, el BCMA y el 239287. El marcador de la superficie de células B de interés particular se expresa preferentemente en las células B en comparación con los otros tejidos de un mamífero que no contienen células B, y puede expresarse tanto en células B precursoras como maduras.

[0073] En la presente memoria descriptiva, "CD79b" se refiere a cualquier CD79b nativo procedente de vertebrados, incluyendo mamíferos como primates (por ejemplo, humanos, monos cynomolgus (cyno)) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se especifique lo contrario. CD79b humano también se denomina "PRO36249" en la presente memoria descriptiva (identificador de secuencia n.º: 2) y codificado por la secuencia de nucleótido (identificador de secuencia n.º: 1) también denominado "DNA225786" en la presente memoria descriptiva. El término "CD79b" engloba CD79b no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de CD79b que derive del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes de CD79b presentes naturalmente, por ejemplo, variantes de ayuste, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos CD79b descritos en la presente memoria descriptiva pueden aislarse a partir de diversas fuentes, como distintas clases de tejido humano o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. Un "polipéptido de CD79b con secuencia nativa" contiene un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de CD79b correspondiente obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos CD79b con secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido CD79b con secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas del polipéptido CD79b específico (*por ejemplo*, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes (*por ejemplo*, formas con empalme alternativo) y variantes alélicas del polipéptido, todas ellas producidas naturalmente. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos CD79b con secuencia nativa detallados en la presente memoria descriptiva son maduros o tienen longitud completa, conteniendo las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que acompañan al texto. En las figuras, los codones de inicio y detención (si se indican) se muestran en estilo negrita y subrayado. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como "N" en las figuras que acompañan al texto con cualquier residuo de ácido nucleico. No obstante, si bien se muestra en las figuras que acompañan al texto que los polipéptidos CD79b detallados en ellas comienzan con residuos de metionina designados en la presente memoria descriptiva como posición 1 de aminoácidos en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina

107

ubicados bien por arriba o por abajo de esa posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan emplearse como el residuo del aminoácido de inicio para los polipéptidos CD79b.

[0074] El término "2F2" se usa en la presente memoria descriptiva para referirse al anticuerpo anti-CD79b monoclonal murino (también denominado "mu2F2" o "2F2 murino") o al anticuerpo quimérico (también denominado "ch2F2" en la presente memoria descriptiva).

[0075] En la presente memoria descriptiva, "mu2F2" o "2F2 murino" se usan específicamente para referirse al anticuerpo anti-CD79b monoclonal murino que comprende el dominio variable de cadena ligera del identificador de secuencia n.°: 10 (Figura 7) y el dominio variable de cadena pesada del identificador de secuencia n.°: 14 (Figuras 8A-B). Se pueden generar mu2F2 de los hibridomas depositados en la ATCC como el PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

[0076] En la presente memoria descriptiva, se usa "ch2F2" o "anticuerpo 2F2 quimérico" para referirse específicamente al anticuerpo quimérico (como se describió previamente en la solicitud de patente de los EE.UU. No. 11/462.336, presentada el 3 de agosto de 2006) en donde el anticuerpo quimérico comprende la cadena ligera del identificador de secuencia n.°: 4 (Figura 4) en donde el dominio variable de cadena ligera comprende el dominio variable del identificador de secuencia n.°: 10 (Figura 7) y el dominio constante de cadena ligera de la IgG1 humana. Además, el anticuerpo quimérico comprende la cadena pesada del identificador de secuencia n.°: 6 (Figura 6) en donde el dominio variable de cadena ligera comprende el dominio variable del identificador de secuencia n.°: 14 (Figuras 8A-B) y el dominio constante de cadena pesada de la IgG1 humana.

[0077] "Injerto 2F2" o "anticuerpo 'humanizado' 2F2 injertado" o "injerto hu2F2" se usa en la presente memoria descriptiva para referirse específicamente a injerto generado al injertar las regiones hipervariables del anticuerpo 2F2 murino (mu2F2) en el aceptor de consenso humano VL Kappa I (huKI) y el subgrupo III de consenso humano VL (huIII) con F71A, I73T y L78A (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89:4285 (1992)) (ver ejemplo 1A y Figuras 7 (identificador de secuencia n.°: 11) y 8 (identificador de secuencia n.°: 15)).

[0078] Por "modificación" de una posición/residuo aminoacídico, como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se entenderá un cambio de una secuencia de aminoácidos primaria con respecto a una secuencia inicial de aminoácidos, de forma que dicho cambio se deba a una alteración en la secuencia que esté relacionada con las posiciones/residuos aminoacídicos en cuestión. Por ejemplo, entre las modificaciones típicas se incluye la sustitución del residuo (o la sustitución en dicha posición) por otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservadora o no conservadora), la inserción de uno o más aminoácidos (por lo general, menos de 5 ó 3) adyacentes a dicho residuo/posición y la deleción del residuo/posición en cuestión. Por "sustitución aminoacídica", o una variación de la misma, se entiende la sustitución de un residuo aminoacídico existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (de inicio) por otro residuo aminoacídico diferente. Por lo general y preferentemente, la modificación da lugar a una alteración de al menos una actividad físico-bioquímica de la variante del polipéptido, con respecto a un polipéptido que incluya la secuencia de aminoácidos inicial (o "de tipo natural"). Por ejemplo, en el caso

de un anticuerpo, una actividad físico-bioquímica que se ve alterada puede ser la afinidad de unión, la capacidad de unión y/o el efecto de unión en una molécula objetivo.

[0079] El término "anticuerpo se usa en su sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos anti-CD79b monoclonales únicos, (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores, anticuerpos de longitud completa o monoclonales intactos), composiciones de anticuerpo anti-CD79b con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada) formada de por lo menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos anti CD79b de cadena única y fragmentos de anticuerpos anti CD76b (ver a continuación), incluyendo Fab, Fab', $F(ab')_2$ y fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos de dominio único (sdAb), siempre y cuando exhiban la actividad biológica o inmunológica deseada. En la presente memoria descriptiva, los términos "inmunoglobulina" (Ig) y "anticuerpo" se utilizan indistintamente. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con maduración de afinidad.

[0080] Por "anticuerpo anti-CD79b" o "anticuerpo que se une a CD79b" se entenderá un anticuerpo con capacidad de unión a CD79b, con suficiente afinidad para que dicho anticuerpo sea útil como agente diagnóstico o terapéutico, o ambos, para actuar contra CD79b. Preferiblemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-CD79b a una proteína no afín no relacionada con CD79b presenta menos de un 10% aproximadamene de unión del anticuerpo a CD79b, según medición, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a CD79b tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 µM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o $\leq 0{,}1$ nM. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD79b se une a un epítopo de CD79b que se conserva entre los CD79b de distintas especies.

[0081] Un "anticuerpo aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En las realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia N terminal o interna de aminoácidos mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. No obstante, en general el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0082] La unidad básica del anticuerpo consta de 4 cadenas y es un compuesto de glicoproteína heterotetramérica constituido por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM compuesto por 5 elementos de la unidad básica de heterotetrámeros junto con un

409

polipéptido adicional llamado cadena J y, por lo tanto, contiene 10 puntos de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes que comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas pesa generalmente unos 150.000 daltons. Cada cadena L se enlaza a una cadena H mediante un enlace bisulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí mediante uno o más enlaces bisulfuro según el isótopo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes bisulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena H tiene, en la terminal N, un dominio variable (V_H) seguida de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isótopos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo terminal N un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primero dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que ciertos residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, p.ej., Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

[0083] La cadena ligera de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases o isótopos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas llamadas α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función del C_H; por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0084] Por "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se entienden los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede referir como "VL". Estos dominios suelen ser las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

[0085] El término "variable" se refiere al hecho de que las secuencias de determinados segmentos de los dominios variables difieren enormemente entre los distintos anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten de trechos relativamente invariantes llamados regiones de estructura (FR) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" que tienen una longitud de 9 a 12 aminoácidos. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas tienen 4 FR cada uno, adoptando mayormente una configuración de hoja β conectada por las tres regiones hipervariables, que forman asas que conectan y algunas veces forman parte de la estructura de hoja β. Las FR mantienen unidas y en

estrecha proximidad las regiones hipervariables de cada cadena, las cuales, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del punto de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los dominios constantes no participan directamente en el proceso de unión al antígeno de un anticuerpo, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

[0086] Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión al antígeno así como un C_L y por lo menos un dominio de cadena pesada constante, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser secuencias nativas de los dominios constantes (*p. ej.* dominios constantes de secuencia nativa humana) o una secuencia de aminoácido variante del mismo. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0087] A efectos de la presente memoria descriptiva, por "anticuerpo desnudo" se entenderá un anticuerpo que no está conjugado con un grupo citotóxico ni un radiomarcador.

[0088] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión al antígeno de dicho anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos están los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. no. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo contiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, conserva la capacidad para unirse al antígeno.

[0089] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab está compuesto por una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente por lo que respecta a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ de gran tamaño que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlace bisulfuro y actividad divalente de unión al antígeno y sigue siendo capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por tener algunos residuos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da en la presente memoria descriptiva al fragmento Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0090] El fragmento Fc comprende las porciones terminal carboxi de ambas cadenas pesadas mantenidas unidas por los bisulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por las

secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) presentes en determinados tipos de células.

[0091] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un punto completo de reconocimiento y unión a antígeno. Este fragmento está compuesto por un dímero del dominio de la región variable de una cadena pesada y otro de una cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera se pueden enlazar covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de forma que las cadenas pesada y ligera se asocien en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis asas hipervariables (tres asas de las cadenas H y L de cada uno de ellos) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior que el punto de unión completo.

[0092] Los "Fv de cadena única", también abreviados "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0093] Por "diacuerpos" se entenderán pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Los pequeños fragmentos de anticuerpos se preparan mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (de entre 5 y 10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de modo que se obtiene un emparejamiento intercadenas pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161; Hudson y col., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y col., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0094] Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además,

112

en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. No debe interpretarse que el modificador "monoclonal" requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología del hibridoma, descrita por primera vez en Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o empleando métodos de ADN recombinante en células bacterianas eucarióticas, ya sean animales o vegetales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de librerías de anticuerpos en fagos empleando las técnicas descritas en Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

[0095] En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" en los cuales una parte de la cadena pesada o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otras especies o pertenecientes a otras clases o subclases de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véase la patente de EE.UU. no. 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés para la presente memoria descriptiva incluyen los anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de dominio variables de unión al antígeno derivadas de un primate no humano (*p. ej.* monos europeos, simios, etc.), y secuencias de regiones constantes humanas.

[0096] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*p. ej.*, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tengan la especificidad, afinidad y capacidad para el anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y típicamente dos, en los que todas, o sustancialmente todas, las asas hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina,

113

típicamente una inmunoglobulina humana. Para más detalles, vea Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

[0097] Cuando se utilice "Thio" en la presente memoria descriptiva para referirse a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo diseñado con cisteína, mientras que "hu", cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo humanizado.

[0098] Un "anticuerpo humano" es aquel que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producción de anticuerpos humanos expuestas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991), Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos también se dispone de los métodos descritos en Cole *y col.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985); Boerner *y col.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración del antígeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta al antígeno presentado, pero cuyos loci endógenos se hayan incapacitado, *p. ej.*, xenoratones inmunizados (véanse, *p. ej.*, las patentes de EE.UU. nos. 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con relación a los anticuerpos humanos generados mediante una tecnología del hibridoma de células B humanas.

[0099] En la presente memoria descriptiva, por "región hipervariable", "HVR" o "HV" se entienden las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia o que forman asas estructuralmente definidas. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En la presente memoria descriptiva se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más frecuentemente usadas (Kabat *y col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de las asas estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El final del asa CDR-H1 de Chotia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del asa (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el asa termina en 32; si sólo está presente 35A, el asa termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el asa termina en 34). Las regiones

hipervariables de AbM representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y las asas estructurales de Chothia y son las utilizadas en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

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

[0100] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables ampliadas" como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35B (H1), 50-65, 47-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable están numerados según Kabat *y col., citado anteriormente*, para cada una de estas definiciones.

[0101] Los residuos de una "estructura" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los residuos de una región hipervariable definidos en la presente memoria descriptiva.

[0102] Los términos "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat", y las variaciones de los mismos, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o CDR del domino variable o a una inserción en ellas. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después de un residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede ser determinada para un anticuerpo dado por una alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

[0103] El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente para referirse a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1 a 107 de la cadena ligera y residuos de 1 a 113 de la cadena pesada) (p. ej., Kabat *y col.*, *Sequences of Immunological Interest.* 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se refiere a un residuo de una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina (p. ej., el índice EU descrito en Kabat *y col., anteriormente citado*). Por "índice EU tal como se describe en Kabat" se entiende la numeración de residuos del anticuerpo humano anti-IgG1 según EU. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva, las referencias a los números de residuos en el dominio variables de los anticuerpos significan la numeración de residuos según el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de residuos según el sistema de numeración EU (p. ej., véase la solicitud provisional de EE.UU. No. 60/640.323, Figuras para numeración EU).

[0104] Un anticuerpo con "maduración de afinidad" es aquél con una o más alteraciones en una o más HVR de éste que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no incluye dicha(s) alteración(es). Los anticuerpos con maduración de afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares al antígeno objetivo. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en el sector. En Marks *y col.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la HVR y/o los residuos estructurales se describen en: Barbas *y col. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *y col. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *y col. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *y col., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *y col, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0105] Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

[0106] En la presente memoria descriptiva, un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0107] Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo IgE anti-humano de un mamífero, es un anticuerpo que tiene mayor afinidad de unión a un antígeno de una primera especie de mamíferos que un homólogo de ese antígeno procedente de una segunda especie de mamíferos. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, que tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente de no más de aproximadamente 1×10^{-8} y más preferentemente aún de no más de 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión a un homólogo del antígeno procedente de una segunda especie de mamíferos no humanos que es al menos aproximadamente 50, 500 ó 1.000 veces inferior a su afinidad de

116

unión al antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los distintos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humano o humanizado.

[0108] Por "afinidad de unión" generalmente se entiende la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula de enlace (por ejemplo, un antígeno). A menos que se especifique lo contrario, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, por "afinidad de unión" se entiende la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X a su molécula de enlace Y se puede representar por lo general mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la especialidad, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos de baja afinidad suelen unirse al antígeno lentamente y suelen disociarse de inmediato, mientras que los anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y suelen permanecer unidos durante más tiempo. Son diversos los métodos de medición de la afinidad de unión conocidos en este ámbito y todos ellos se pueden utilizar para los fines de la presente invención. A continuación, se describen, a modo de ejemplo, formas de realización específicas.

[0109] Cuando se usa "o mejor" en la presente memoria descriptiva, se refiere a una unión más durable entre una molécula y su molécula de enlace. Cuando se usa "o mejor" en la presente memoria descriptiva, se refiere a una unión más durable, representada por un menor valor numérico Kd. Por ejemplo, cuando un anticuerpo que tiene afinidad por un antígeno de ",6nM o mejor", la afinidad del anticuerpo por el antígeno es <,6 nM, es decir, ,59 nM, ,58 nM, ,57 nM, etc., o cualquier valor menor a ,6 nM.

[0110] En una forma de realización, la "Kd" o el "valor Kd" según esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígenos radiomarcados (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, descrito por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab a antígenos equilibrando los Fab con una concentración mínima del antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado y, luego, capturando el antígeno unido con una placa con revestimiento de anticuerpos anti-Fab (Chen, y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) son recubiertas durante toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6) y, a continuación, son bloqueadas con 2% (p/v) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (22ºC aproximadamente). En una placa no adsorbente (Nunc no. 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, que concuerda con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) *Cancer Res.*125 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; no obstante, la incubación puede continuar durante más tiempo (por ejemplo, 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se añaden 150 µl/pocillo de

centelleador (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que proporcionen un 20%, o un porcentaje inferior, de unión máxima para utilizarlas en ensayos de unión competitivos. Según otra forma de realización, el Kd o valor Kd se mide utilizando análisis de resonancia plasmón de superficie que usa BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil)-carboxidiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a un caudal de 25 µl/min. aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) al encajar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como el cociente k_{off}/k_{on}. Véase, p. ej., Chen, Y., y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa on excede 10^6 M^{-1} S^{-1} en el ensayo de resonancia plasmón antes mencionado, entonces la tasa on se puede determinar usando una técnica de absorción de fluorescencia que mide el incremento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti antígeno de 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en la presencia de concentraciones aumentantes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con módulo stop-flow (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con un tubo para revolver.

[0111] Una "tasa on" o "tasa de asociación" o "k_{on}", de acuerdo con esta invención, también se puede determinar con la misma técnica de resonancia plasmón de superficie antes descrita, usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) como se describió antes.

[0112] Las frases "sustancialmente similar" o "sustancialmente el/la mismo(a)", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, indican un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de control/referencia), de forma que cualquier experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de escasa o ninguna significación estadística o biológica dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre estos dos valores es, preferiblemente, inferior al 50% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 40% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 30% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 20% aproximadamente; preferiblemente, inferior al 10% aproximadamente como función del valor para el anticuerpo de control/referencia.

118

[0113] Las frases "sustancialmente reducido(a)", "sustancialmente diferente", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva" denotan un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significación estadística o biológica dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd, respuesta HAMA). La diferencia entre estos dos valores es, preferiblemente, superior al 10% aproximadamente; preferiblemente, superior al 20% aproximadamente; preferiblemente, superior al 30% aproximadamente; preferiblemente, superior al 40% aproximadamente; preferiblemente, superior al 50% aproximadamente como función del valor para el anticuerpo de control/referencia.

[0114] Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo se puede unir selectivamente. El antígeno diana puede ser un polipéptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido, un hapteno o un compuesto de ellos, sintético o que se produzca naturalmente. El antígeno diana es, preferiblemente, un polipéptido.

[0115] A efectos de la presente memoria descriptiva, una "estructura humana del aceptor" es una estructura que comprende la secuencia aminoacídica de una estructura de VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulinas humanas, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana del aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulinas humanas o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de éstas o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En el caso de que estén presentes cambios en la secuencia de aminoácidos, habrá preferente un máximo de 5 y, preferentemente, 4 o menos, o 3 o menos cambios preexistentes de aminoácidos. En el caso de que haya cambios preexistentes de aminoácidos en una VH, estos cambios, preferentemente, están solo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, la estructura humana de VL del aceptor tiene una secuencia idéntica a la de la estructura de VL de la inmunoglobulina humana o a de la estructura de consenso humana.

[0116] Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa el residuo de aminoácidos más frecuente en una selección de secuencias de estructura de VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza en un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *y col.* En una forma de representación, para VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *y col.* En una forma de representación, para VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *y col.*

419

[0117] Una "estructura de consenso de VH del subgrupo III" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el dominio variable pesado del subgrupo III de Kabat *y col.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del VH del subgrupo III comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (identificador de secuencia n.º: 69)-H1-WVRQAPGKGLEWV (identificador de secuencia n.º: 70)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (identificador de secuencia n.º: 71)-H3-WGQGTLVTVSS (identificador de secuencia n.º: 72).

[0118] Una "estructura de consenso del subgrupo I del VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat *y col.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso de VL del subgrupo I comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (identificador de secuencia n.º: 65)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (identificador de secuencia n.º: 66)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (identificador de secuencia n.º: 67)-L3-FGQGTKVEIKR (identificador de secuencia n.º: 68).

[0119] Una "estructura humana no modificada" es una estructura humana que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la estructura humana del aceptor, *p. ej.* carece de sustituciones de aminoácidos humanos a no humanos en la estructura humana del aceptor.

[0120] A efectos de la presente memoria descriptiva, una "región hipervariable alterada" es una región hipervariable que comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*p. ej.*, de 1 a unas 16) en ella.

[0121] A efectos de la presente memoria descriptiva, una "región hipervariable no modificada" es una región hipervariable con la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del cual se derivó, *p. ej.*, uno que carezca de una o más sustituciones de aminoácidos.

[0122] Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, es decir, un antígeno objetivo polipéptido asociado a un tumor, es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo es útil como agente terapéutico al reconocer una célula o un tejido que expresa el antígeno sin tener una reacción cruzada significativa con otras proteínas. En tales formas de realización, el alcance de la unión del anticuerpo a una proteína "no objetivo" será aproximadamente de menos del 10% de la unión del anticuerpo a su proteína objetivo particular según lo determinado por el análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula objetivo, los términos "unión específica", "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular, o un epítopo en un polipéptido objetivo determinado, significan que la unión es sensiblemente diferente a la de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que, por lo general, es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse mediante competencia con una molécula de control que sea similar a la diana, por ejemplo, el excedente de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si el excedente de la diana no marcada inhibe de forma competitiva la unión de la diana

120

marcada a una sonda. Los términos "unión específica", "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido objetivo particular, como se usa en la presente memoria descriptiva, se puede exhibir, por ejemplo, mediante una molécula que tiene un Kd para el objetivo de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular, o un epítopo en un polipéptido determinado, sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

[0123] Un antagonista que "inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido de CD79b" o un antagonista "inhibidor del crecimiento" es aquel que da lugar a una inhibición mensurable del crecimiento de células cancerosas que expresen o sobreexpresen el polipéptido CD79b apropiado. El polipéptido CD79b puede ser un polipéptido transmembrana que se exprese en la superficie de una célula cancerosa o un polipéptido producido y secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-CD79b preferentes, inhibidores del crecimiento, inhiben el crecimiento de células tumorales que expresen CD79b en un grado superior al 20%, preferentemente entre un 20% y un 50% aproximadamente, y, con mayor preferencia, superior al 50% (por ejemplo, entre el 50% y el 100% aproximadamente), en comparación con el control correspondiente, que suele ser un grupo de células cancerosas no tratadas con el anticuerpo que se esté probando. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración del anticuerpo comprendida entre unos 0,1 y 30 µg/ml o unos 0,5 nM y 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina entre 1 y 10 días tras la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de formas diversas como se describe más adelante en la sección Ejemplos experimentales. El anticuerpo es un inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-CD79b, a concentraciones comprendidas aproximadamente entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, da lugar a la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación celular entre unos 5 días y 3 meses después de la primera administración del anticuerpo, preferentemente dentro de unos 5 y 30 días.

[0124] Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada tal como se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción de las células, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente una que sobreexprese un polipéptido CD79b. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula hematopoyética, tal como una célula B, una célula T, un basófilo, un eosinófilo, un neutrófilo, un monocito, una plaqueta o un eritrocito. Existen diversos procedimientos para evaluar los sucesos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) puede medirse mediante

121

la unión de anexina, la fragmentación del ADN puede evaluarse a través de su escalonamiento y la condensación nuclear/de cromatina, junto con la fragmentación del ADN, puede evaluarse en función de cualquier aumento de células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis hace que se desarrolle un nivel de inducción de la unión a anexina entre 2 y 50 veces, preferentemente entre 5 y 50 veces, y más preferentemente entre 10 y 50 veces, a las células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

[0125] Un anticuerpo que "induce la muerte celular" hace que una célula viable se convierta en una célula no viable. La célula se expresa en un polipéptido CD79b y es un tipo de célula que específicamente se expresa o se sobreexpresa en un polipéptido CD79b. La célula puede ser cancerosa o de tipo normal de tipo particular de células. El polipéptido CD79b puede ser un polipéptido transmembrana que se expresa en la superficie de una célula cancerosa o un polipéptido producido y secretado por una célula cancerosa. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B o una célula T. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de células inmunoefectoras y de complemento a fin de distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o por citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). Por tanto, el ensayo de detección de muerte celular se puede llevar a cabo utilizando suero desactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células inmunoefectoras. Para determinar si el anticuerpo tiene capacidad para inducir la muerte celular se puede evaluar la pérdida de la integridad de la membrana mediante evaluación de la absorción de yoduro de propidio (PI), azul de tripan (véase Moore y col., Cytotechnology 17:1-11 (1995)) o 7AAD con respecto a células no tratadas. Los anticuerpos preferentes que inducen la muerte celular son aquellos que inducen la absorción de PI en un ensayo de absorción de PI en células BT474.

[0126] Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o una región Fc variable de una secuencia aminoacídica) de un anticuerpo y puede variar con el isótopo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: La unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complementos, la unión a receptores de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

[0127] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "región Fc" define una región en el extremo terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y variantes de regiones Fc. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define normalmente como la extensión que va desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o la Pro230, hasta el extremo carboxi terminal de la misma. La lisina del extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena

122

pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos que tengan todos los residuos K447 suprimidos, los conserven todos o contengan una mezcla de anticuerpos con y sin dichos residuos.

[0128] Una "región Fc funcional" tiene una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Algunos ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión al C1q, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación descendente de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B, BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (*p. ej.*, el dominio variable de un anticuerpo) y se pueden evaluar mediante diversos ensayos, tal y como se describen en las definiciones de la presente memoria descriptiva, por ejemplo.

[0129] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se puede encontrar en la naturaleza. Las regiones Fc humanas con secuencia nativa incluyen una región Fc de la IgG1 humana con secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de la IgG2 humana con secuencia nativa; región Fc de la IgG3 humana con secuencia nativa; y región Fc de la IgG4 humana con secuencia nativa, así como las variantes de las mismas que se producen naturalmente.

[0130] La "variante de una región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de secuencia nativa al menos en una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, aproximadamente entre una y diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente entre una y cinco sustituciones en una región Fc de secuencia nativa o la región Fc del polipéptido progenitor. La variante de la región Fc de la presente memoria descriptiva tendrá preferentemente al menos un 80% de homología con relación a una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de un polipéptido progenitor, y más preferentemente, al menos un 90% de homología con las mismas, y más preferentemente aún, al menos un 95% de homología con las mismas.

[0131] La "citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una Ig secretada y unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan de forma específica a una célula objetivo que porte un antígeno y, posteriormente, la destruyan con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células principales para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, como el que se describe en las

123

patentes de EE.UU. nos 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como el que se detalla en Clynes y col., (EE.UU.), 95:652-656 (1998).

[0132] El término "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye las subclases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas de ayuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias similares de aminoácidos que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor promotor FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo promotor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (véase la revisión M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel y col., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluidos aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva. El término también incluye al receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgG materna al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0133] La unión de FcRn humano *in vivo* y la semivida sérica de los polipéptidos de unión de alta afinidad al FcRn humano pueden analizarse, *p. ej.*., en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o primates a los que se administran polipéptidos con una variante de la región Fc. En el documento WO 2000/42072 (Presta) se describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcR mejorada o disminuida. Véase también, *p. ej.*, Shields *y col. J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

[0134] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, pero son las PBMC y las NK las células preferentes. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

[0135] La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., J.

124

Immunol. Methods 202:163 (1996). Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una variante de la región Fc) y capacidad aumentada o disminuida de unión a C1q se describen, *p. ej.*, en la patente de EE.UU. n.º 6,194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Véase también, *p.ej.* Idusogie *y col., J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0136] Por "anticuerpo que comprende la región Fc" se entiende un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede ser eliminada, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo, o recombinando el ácido nucleico que codifica al anticuerpo. Por tanto, una composición que contenga un anticuerpo con una región Fc según esta invención puede comprender un anticuerpo con el K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0137] El "dominio extracelular" o "ECD" de un polipéptido CD79b se refiere a una forma de polipéptido CD79b que esencialmente está libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Por lo general, el ECD de un polipéptido CD79b tendrá menos de un 1%, preferentemente menos de un 0,5%, de tales dominios transmembrana o citoplásmico. Se comprenderá que la identificación de cualquier dominio transmembrana para los polipéptidos CD79b de la presente invención se realiza de acuerdo con los criterios empleados rutinariamente en la materia para identificar esa clase de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar aunque, lo más probable, en no más de 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del dominio, tal como se ha identificado inicialmente en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b puede contener 5 aminoácidos o menos en cualquier extremo del límite del dominio transmembrana/extracelular, tal como se identifica en los Ejemplos o en la especificación; y tales polipéptidos, con o sin el péptido de señal asociado, así como el ácido nucleico que los codifica, se contemplan en la presente invención.

[0138] La ubicación aproximada de los "péptidos de señal" de los diversos polipéptidos CD79b detallados en la presente memoria descriptiva puede mostrarse en la presente especificación o en las figuras que la acompañan. No obstante, debe tenerse en cuenta que el límite del terminal C de un péptido de señal puede variar aunque, lo más probable, en no más de 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite del terminal C del péptido de señal, tal como se ha identificado inicialmente en la presente memoria descriptiva, pudiendo identificarse el límite del terminal C del péptido de señal de acuerdo con los criterios empleados rutinariamente en la materia para identificar esa clase de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y col., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la segmentación de una secuencia de señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, resultando en más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido de señal se segmenta en un tramo no superior a 5 aminoácidos en cualquier extremo del límite del terminal C del péptido de señal, tal como se identifica en la presente memoria descriptiva, así como los polinucleótidos que los codifican, se contemplan en la presente invención.

125

[0139] La "variante de un polipéptido CD79b" significa un polipéptido CD79b, preferentemente activo, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que tiene al menos un 80% de homología de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido CD79b carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido CD79b de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva (como los que codifica un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificadora completa de un polipéptido CD79b de longitud completa). Estas variantes de polipéptidos CD79b incluyen, por ejemplo, polipéptidos CD79b en los que se agregan o eliminan uno o más residuos de aminoácidos, en los terminales N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Por lo general, la variante de un polipéptido CD79b tendrá al menos un 80% de homología de la secuencia de aminoácidos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología de la secuencia de aminoácidos, de una secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido CD79b carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de un polipéptido CD79b de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Por lo general, las variantes de polipéptidos CD79b tienen una longitud de al menos 10 aminoácidos, y alternativamente de al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 o más. Opcionalmente, las variantes de polipéptidos CD79b no tendrán más de una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa del polipéptido CD79b, y alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos, en comparación con la secuencia nativa del polipéptido CD79b.

[0140] El "Porcentaje (%) de homología de la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos, por ejemplo las secuencias de polipéptidos CD79b identificados en la presente memoria descriptiva, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en un secuencia candidata que es idéntico a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, es decir, una secuencia de polipéptidos CD79b, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología de la secuencia y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la homología de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o

126

Megalign (DNASTAR). Los expertos en este campo pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores del porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático para comparación de secuencias ALIGN-2; en la siguiente Tabla 1 se proporciona el código fuente completo para el programa ALIGN-2. El programa informático ALIGN-2 para comparación de secuencias fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente que se incluye en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU. (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde ha quedado inscrito en el Registro de Derechos de Autor de EE. UU. con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente suministrado en la siguiente Tabla 1. Este programa debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias y estos no varían.

[0141] En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia aminoacídica A con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B (lo que también se puede expresar diciendo que una determinada secuencia aminoacídica A tiene o contiene un porcentaje concreto de homología de la secuencia aminoacídica con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es la cantidad de residuos de aminoácidos establecidos como coincidencia total por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación que ese programa hace de A y B, y en la que Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se detectará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual que el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos B con respecto a A.

[0142] Un "polinucleótido con variante CD79b" o una "secuencia de ácidos nucleicos con variante CD79b" significa una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido CD79b, preferentemente activo, tal como se define en la presente memória descriptiva, y tiene al menos un 80% de homología de la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleótidos que codifica la secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente

127

memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido CD79b de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva (como los que codifica un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificadora completa de un polipéptido CD79b de longitud completa). Por lo general, un polinucleótido con variante CD79b tendrá al menos un 80% de homología de la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de homología de la secuencia de ácidos nucleicos, de una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido CD79b con secuencia nativa de longitud completa carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido CD79b, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido CD79b de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Las variantes no engloban la secuencia nativa de nucleótidos.

[0143] Ordinariamente, las variantes de polinucleótidos CD79b tienen una longitud de por lo menos 5 nucleótidos o, alternativamente, de por lo menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos, donde, en este contexto, el término "alrededor de" significa la longitud de referencia de la secuencia de nucleótidos con 10% más o menos de esa longitud de referencia.

[0144] El "porcentaje (%) de homología de la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican CD79b identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son homólogos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de CD79b de interés, después de alinear las secuencias e introducir interrupciones, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de homología de la secuencia de ácidos nucleicos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores del porcentaje de homología de la secuencia de ácidos nucleicos se generan usando el programa informático para comparación de secuencias ALIGN-2; en la siguiente Tabla 1 se proporciona el código fuente completo para el programa ALIGN-2. El programa informático ALIGN-2 para comparación de secuencias fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente que se incluye en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU. (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde ha quedado inscrito en el Registro de

128

Derechos de Autor de EE. UU. con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente suministrado en la siguiente Tabla 1. Este programa debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0145] En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el porcentaje de homología de la secuencia de ácidos nucleicos de una determinada secuencia de ácidos nucleicos C con respecto a una determinada secuencia de ácidos nucleicos D (que alternativamente puede expresarse diciendo que una determinada secuencia de ácidos nucleicos C tiene o contiene cierto porcentaje de homología de la secuencia de ácidos nucleicos de una determinada secuencia de ácidos nucleicos D) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción W/Z

en la que W es la cantidad de nucleótidos establecidos como coincidencia total por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación hecha por ese programa de C y D, y en la que Z es la cantidad total de nucleótidos en D. Se detectará que, cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no sea igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el porcentaje de identificación de la secuencia de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al porcentaje de identificación de la secuencia de ácidos nucleicos de D con respecto a C. A menos que se indique lo contrario, todos los valores del porcentaje de la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0146] En otras formas de realización, las variantes de polinucleótidos CD79b son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido CD79b y son capaces de hibridar, preferentemente en condiciones rigurosas de hibridación y lavado, con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD79b de longitud completa, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las variantes de polipéptidos CD79b pueden ser las que se codifican mediante una variante de un polinucleótido CD79b.

[0147] El término "región codificadora de longitud completa", cuando se emplea en referencia a un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD79b, se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD79b de longitud completa de la invención (que a menudo se muestra entre codones de inicio y detención, incluso en las figuras que acompañan al texto). El término "región codificadora de longitud completa", cuando se emplea en referencia a un ácido nucleico depositado en la ATCC, se refiere a la porción que codifica el polipéptido CD79b del ADNc insertado en el vector depositado en la ATCC (que a menudo se muestra entre codones de inicio y detención, incluso en las figuras que acompañan al texto (los codones de inicio y detención están en negritas y subrayados en las figuras)).

[0148] El término "aislado", cuando se usa para describir los distintos polipéptidos CD79b descritos en la presente memoria descriptiva, significa que se trata de un polipéptido que se ha identificado y separado o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían en los usos terapéuticos del polipéptido y podrían incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En formas de realización preferentes, el polipéptido se purificará (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (2) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras empleando una tinción de azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los polipéptidos aislados incluyen el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido CD79b no estará presente. En cualquier caso, normalmente el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0149] Un ácido nucleico que codifica a un polipéptido CD79b "aislado" u otro ácido nucleico que codifica a un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante que normalmente está asociada a la fuente natural del ácido nucleico que codifica al polipéptido. Una molécula de ácidos nucleicos que codifiquen un polipéptido aislado es distinta de la que se encuentra en la naturaleza, tanto por su forma como entorno. Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos aislados se distinguen de la molécula de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido específico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácidos nucleicos que codifique un polipéptido aislado incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos contenidos en células que habitualmente expresan el polipéptido en casos en los que, por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos esté en una posición cromosómica distinta de la que tiene en las células naturales.

[0150] Por "secuencias de control" se entenderán las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora enlazada de forma funcional en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son aptas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operadores y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0151] El ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o un líder secretor está operativamente enlazado al ADN de un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente enlazado a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; y un sitio de unión al ribosoma está operativamente enlazado a una secuencia de codificación si está situado para facilitar la traducción. Por lo general, por "enlazado de forma operable" se entiende que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se consigue mediante ligado en sitios de restricción

130

apropiados. Si esos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de conformidad con la práctica habitual.

[0152] Cualquier experto en la materia puede determinar rápidamente las "condiciones restrictivas" de las reacciones de hibridación, tratándose por lo general de un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, para realizar una hibridación correcta, las sondas más largas requieren temperaturas superiores, mientras que las sondas más cortas precisan temperaturas menores. La hibridación depende habitualmente de la capacidad de rehibridación del ADN desnaturalizado ante la presencia de hebras complementarias en un entorno con temperatura inferior a su punto de fusión. Cuanto más elevado sea el grado deseado de homología entre la sonda y la secuencia susceptible de hibridación, más alta será la temperatura relativa que podrá emplearse. Como consecuencia, las temperaturas relativas más altas tenderían a perfilar unas condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las más bajas desarrollarán unas condiciones menos rigurosas. Para más detalles y una explicación sobre las condiciones restrictivas de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0153] Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", tal como se definen en la presente memoria descriptiva, pueden identificarse como aquéllas que: (1) emplean para el lavado una fuerza iónica baja y temperaturas altas, por ejemplo, 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/sulfato de sodio dodecilo al 0,1% a 50°C; (2) durante la hibridación emplean un agente desnaturalizante, como la formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico de 50 mM con un pH de 6,5 y 750 mM de cloruro sódico, 75 mM de citrato sódico a 42°C; o (3) hibridación durante toda la noche en una solución que emplea formamida al 50%, 5 porciones de SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato sódico), 50 mM de fosfato sódico (pH de 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 porciones de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 minutos a 42°C en 0,2 porciones de SSC (cloruro sódico/citrato sódico), seguido de un lavado de alta rigurosidad durante 10 minutos compuesto por 0,1 porciones de SSC con EDTA a 55°C.

[0154] Las "condiciones moderadamente restrictivas" pueden identificarse tal como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y unas condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, concentración iónica y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas sería la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que contenga: 20% de formamida, 5 porciones de SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato sódico (pH de 7,6), 5 porciones de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 1 porción de SSC a una temperatura comprendida entre 37 y 50°C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la concentración iónica, etc., como sea necesario para integrar factores como la longitud de la sonda y otros similares.

131

[0155] El término "señalizado con epítopo", cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un polipéptido quimérico que contiene un polipéptido CD79b o un anticuerpo anti-CD79b fusionado a un "polipéptido señalizado". El polipéptido señalizado tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual se pueda elaborar un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera en la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido señalizado es, también, preferentemente, único, de forma que el anticuerpo no tenga una reacción cruzada sustancial con otros epítopos. Por lo general, los polipéptidos señalizados aptos tienen al menos 6 residuos de aminoácidos, siendo la cantidad habitual entre 8 y 50 (preferentemente, entre 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0156] A efectos de la presente memoria descriptiva, por "activa" o "actividad" se entiende la forma o formas de un polipéptido CD79b que conserva una actividad biológica o inmunológica de un CD79b nativo u obtenido naturalmente, en el que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibidora o estimuladora) causada por un CD79b nativo u obtenido naturalmente distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que forme parte de un CD79b nativo u obtenido naturalmente, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que forme parte de un CD79b nativo u obtenido naturalmente.

[0157] El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o completamente bloquee, inhiba o neutralice una actividad biológica de un polipéptido CD79b nativo. De forma similar, El término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido CD79b nativo. Las moléculas agonistas o antagonistas aptas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos CD79b nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Uno de los métodos para identificar los agonistas o antagonistas de un polipéptido CD79b puede consistir en poner en contacto a un polipéptido CD79b con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido CD79b.

[0158] Por "purificada" se entiende una molécula que está presente en una muestra a una concentración de al menos el 95% de su peso, o al menos el 98% del peso de la muestra en la que está contenida.

[0159] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos una de las otras moléculas de ácido nucleico con las que se acocia habitualmente, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula aislada de ácido nucleico incluye, además, una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural.

[0160] En la presente memoria descriptiva, por "vector" se entiende una molécula de un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido",

término que hace referencia a un asa de ADN circular de doble hebra al que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos adicionales de ADN se pueden ligar al genoma vírico. Algunos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en un anfitrión celular en que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales en mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales en mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ésta y, de este modo, se replican al mismo tiempo que el genoma del huésped. Asimismo, existen vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados por su función. En la presente memoria descriptiva estos vectores se denominan "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante tienen con frecuencia la forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos "plásmido" y "vector" son intercambiables, dado que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente usada.

[0161] En la presente memoria descriptiva, "polinucleótido", o "ácido nucleico", son términos usados indistintamente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede producir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede verse interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse nuevamente tras la síntesis, por ejemplo mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "cofias", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de forma natural por un análogo; modificaciones de enlaces internucleótidos, como aquellas en las que intervienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); las que contienen porciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.); las que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.); las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.); las que contienen alquilantes; las que contienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas de uno o más polinucleótidos. Asimismo, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos de fosfonatos, grupos fosfatos, protegerse mediante grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH de los extremos 5' y 3' puede fosforilarse y sustituirse por aminas o porciones de grupos orgánicos en casquete (capping) de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o

desoxirribosa que son generalmente conocidos en este ámbito; por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleósidos básicos como metil ribosida. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden sustituirse por otros grupos de enlace alternativos. Estos grupos alternativos de enlace incluye formas de realización en las que el fosfato es sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2 ("formacetal"), entre otros, donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1 a 20 átomos de carbono) que contiene opcionalmente un enlace a éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente memoria descriptiva, incluyendo el ARN y el ADN.

[0162] En la presente memoria descriptiva, por "oligonucleótido" se entiende, por lo general, polinucleótidos cortos, habitualmente de hebra única y sintéticos, que suelen tener una longitud inferior a 200 nucleótidos, aunque no necesariamente. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anteriormente incluida sobre polinucleótidos es aplicable igualmente y en su integridad a los oligonucleótidos.

[0163] Los términos "cáncer" y "canceroso" describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematopoyéticos o relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o neoplasias linfoides, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos y también carcinoma, blastoma y sarcoma. Otros ejemplos particulares de cáncer incluyen los cánceres asociados con las células B, incluyendo, por ejemplo, linfomas intermedios o de bajo grado (incluyendo linfomas de células B tales como linfoma de células B de mucosa asociada a tejido linfoide y linfoma no de Hodgkin (LNH), linfoma de las células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica (LLC), tales como la leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, como la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoide, tal como la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y mielodisplasia), y otros cánceres hematológicos o asociados a las células B o T. También están incluidos los cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo los leucocitos polimorfonucleares, tales como los basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y células asesinas naturales. También están incluidos los trastornos cancerosos de células B proliferativas, entre otros: linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. Los orígenes de los cánceres de células B incluyen los siguientes: el linfoma de zona marginal de células B se origina en las células B de memoria en

134

la zona marginal, el linfoma folicular y el linfoma difuso de células B grandes se originan en los centrocitos en la zona clara de los centros germinales, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfocítica pequeña se originan en las células B1 (CD5+), el linfoma de las células del manto se origina en las células B vírgenes 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 "tejidos celulares hematopoyéticos" en la presente memoria descriptiva, incluyen el timo y la médula ósea y los tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo, los módulos linfáticos, los tejidos linfoides asociados con las mucosas, tales como los tejidos linfoides asociados a la mucosa intestinal, las amígdalas, las placas de Peyer y el apéndice y los tejidos linfoides asociados con otras mucosas, como por ejemplo el recubrimiento bronquial. Ejemplos más concretos de estas clases de cánceres son el cáncer de células escamosas, el cáncer de células pulmonares pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar escamoso, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioma, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, la leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0164] En la presente memoria descriptiva, una "neoplasia maligna de las células B" incluye el linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo LNH folicular de bajo grado, LNH linfocítico de célula pequeña (SL), LNH folicular de grado intermedio, LNH difuso de grado intermedio, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no divididas de alto grado, LNH voluminoso, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin con predominio linfocítico (EHPL), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), leucemia linfocítica crónica (LLC), LNH indolente, incluyendo LNH indolente recurrente y LNH indolente resistente a rituximab, leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica, linfoma de células del manto y otros tumores hematológicos. Dichos tumores pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de la superficie de células B, como los CD79b. Estas enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva se tratan mediante la administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células B, tal como el CD79b e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva también se tratan mediante una terapia combinada que incluye un anticuerpo anti-CD79b o un conjugado de anticuerpo anti-CD79b con fármacos de la invención combinado con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo con fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie. Un método de tratamiento ejemplar de la invención es un anticuerpo anti-CD79b de la invención que se administra en combinación con un

135

anticuerpo anti-CD20, una inmunoglobulina o un fragmento de unión a CD20 del anticuerpo, ya sea en conjunto o de manera secuencial. El anticuerpo anti-CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de anticuerpo con fármacos. En una forma de realización de la terapia combinada, el anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti-CD20 es Rituxan® (rituximab).

[0165] El término "linfoma no Hodgkin" o "LNH", como se emplea en la presente memoria descriptiva, se refiere a un cáncer del sistema linfático que no son linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin se pueden diferenciar generalmente de los linfomas no Hodgkin por la presencia de células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y por la ausencia de dichas células en los linfomas no Hodgkin. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin englobados por este término según se utiliza en la presente memoria descriptiva incluyen cualquiera que un experto en la materia pudiera identificar como tal (por ejemplo un oncólogo o un patólogo) según los esquemas de clasificación conocidos en la materia, como el esquema REAL (siglas en inglés de Revised European-American Lymphoma [Linfoma revisado europeo-americano]) según se describe en el Color Atlas of Clinical Hematology (3.ª edición), A. Victor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Véanse, en particular, las listas en las figuras 11.57, 11.58 y 11.59. Otros ejemplos más específicos incluyen, entre otros, LNH refractario o recurrente, LNH de bajo grado con tratamiento de primera línea, LNH en fase III/IV, LNH resistente a quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblástico de células B precursoras, linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia linfocítica crónica de células B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma prolinfocítico de células B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de zona marginal, linfoma esplénico de zona marginal, linfoma de zona marginal extranodal (MALT), linfoma de zona marginal nodal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma folicular de bajo grado, LNH folicular de grado intermedio, linfoma de células del manto, linfoma del centro de los folículos (folicular), LNH difuso de grado intermedio, linfoma difuso de células B de gran tamaño, LNH agresivo (incluido LNH agresivo con tratamiento de primera línea y LNH agresivo recurrente), LNH recurrente después o refractario al autotrasplante de células madre, linfoma primario mediastinal de células B de gran tamaño, linfoma primario con derrame, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no divididas de grado alto, LNH voluminoso, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular amplia precursora (periférica), micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfomas cutáneos, linfoma de células pequeñas anaplásicas, linfoma angiocéntrico.

[0166] Un "trastorno" es un proceso que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Comprende trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidos los procesos patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que serán tratados en la presente memoria incluyen condiciones cancerosas tales como tumores malignos y benignos; tumores no leucémicos y linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos y otros trastornos asociados a

angiogénesis. Los trastornos incluyen además las condiciones cancerosas tales como los trastornos proliferativos de células B o los tumores de las células B, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo relapsado, LNH indolente relapsado, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0167] Los términos "trastorno de la proliferación celular" y "trastorno de la proliferación" se refieren a trastornos asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno de la proliferación celular es cáncer.

[0168] En la presente memoria descriptiva, el término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto benignos como maligno, así como todos los tejidos y células cancerosos y precancerosos.

[0169] En la presente memoria descriptiva, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o un trastorno que se genera en, y se dirige contra, los propios tejidos u órganos de un individuo, un cocegregado o una manifestación de éste o un estado resultante de todo ello. En muchos de estos trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, pueden existir diversos marcadores clínicos y de laboratorio, entre ellos, hipergammaglobulinemia, niveles altos de autoanticuerpos, depósitos del complejo antígeno-anticuerpo en tejidos, beneficio de tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores y agregados de linfocitos en tejidos afectados. Sin limitarse a ninguna teoría relacionada con las enfermedades autoinmunes mediadas por células B, se cree que las células B demuestran un efecto patogénico en las enfermedades autoinmunes humanas mediante diversos mecanismos, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes, la activación dendrítica y de células T, la síntesis de citoquinas, la eliminación directa de quimioquinas; también se cree que estas células proporcionan un nido para la neolinfogénesis ectópica. Cada una de estas vías puede influir de diferentes formas en la patología de las enfermedades autoinmunes.

[0170] La enfermedad autoinmune puede ser una enfermedad de un órgano específico (es decir, la respuesta inmune se dirige específicamente contra un sistema orgánico tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y hepáticos, el sistema renal, el tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a muchos sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, polimiositis, etc.). Dichas enfermedades preferentes incluyen trastornos reumatológicos autoinmunes (como por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como el LES y el lupus nefrítico, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunes (como por ejemplo, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (como por ejemplo, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangeítis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunes (como por ejemplo, esclerosis

137

múltiple, síndrome opsoclono-mioclono, síndrome de mioclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (como por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (como por ejemplo, psoriasis, urticaria, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (como por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmune), ateroesclerosis, uveítis, enfermedades hipoacústicas autoinmunes (como por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, transplante de órganos, y enfermedades endocrinas autoinmunes (como por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes tales como la diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Las enfermedades más preferentes incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

[0171] Los ejemplos específicos de otras enfermedades autoinmunes, tal y como se definen en la presente memoria descriptiva que, en algunos casos, abarcan aquellas que se mencionaron anteriormente, incluyen, entre otras, artritis (aguda y crónica, artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide de inicio juvenil y etapas tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis que reduce los estrógenos y espondilitis anquilosante/reumatoide), enfermedad linfoproliferativa autoinmune, enfermedades de la piel hiperproliferativas e inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis en placa, psoriasis gutatta, psoriasis pustular y psoriasis de las uñas, atopía, incluyendo enfermedades atópicas como la fiebre del heno y el síndrome de Job, dermatitis, incluyendo dermatitis por contacto, dermatitis por contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, urticaria, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis por contacto irritante primaria, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado al x, enfermedades intraoculares alérgicas e inflamatorias, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria crónica autoinmune, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrolisis epidérmica tóxica, esclerodema (incluyendo esclerodema sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como EM espino-óptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM recurrente remitente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, ateroesclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades intestinales de origen autoinmune, inflamación gastrointestinal, colitis como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis polipósa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural, y enfermedad intestinal inflamatoria

autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de trastorno respiratorio, incluyendo síndrome de trastorno respiratorio adulto o agudo (STRAA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, enfermedades de injerto contra huésped, angioedema tal como angioedema hereditario, daño del nervio craneal como en el caso de la meningitis, herpes gestationis, penfigoide gestationis, prurito de escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, hipoacusia súbita debido a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis como encefalitis de Rasmussen, encefalitis límbica y/o encefálica, uveítis, como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN de origen inmune, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN de membrana o membranosa proliferativa (GNMP), incluyendo Tipo I y Tipo II, y GN progresiva rápida (GNPR), nefritis proliferativa, insuficiencia poliglandular endocrina autoinmune, balanitis incluyendo balanitis circunscrita plasmocelular, balanopostitis, eritema anular centrífuga, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nitidus, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis laminar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenosa, afecciones y respuestas alérgicas, alergias a los alimentos, alergias a los fármacos, alergias a los insectos, enfermedades alérgicas poco frecuentes tales como mastocitosis, reacción alérgica, eccema, incluyendo eccema alérgico o atópico, eccema asteatótico, eccema dishidrótico y eccema vesicular palmoplantar, asma tal como asma bronquial y asma autoinmune, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos extraños tales como grupos sanguíneos fetales A-B-O durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus, incluyendo nefritis, cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra renal, lupus discoide y lupus discoide eritematoso, alopecia, LES tal como LES cutáneo o LES cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (SLN) y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluyendo IDDM pediátrico, diabetes mellitus de inicio adulto (diabetes Tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, colitis diabética, alteración de las grandes arterias diabética, respuestas inmunes asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos tal como polimialgia reumática y células gigantes (arteritis de Takayasu), vasculitis de vasos medianos tal como enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa, ovasculitis inmune, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante tal como vasculitis necrotizante fibrinoide y vasculitis necrotizante sistémica, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA tal como el síndrome de Churg-Strauss (SCS), granulomatosis de Wegener y poliangiitis microscópica), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de

Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune, incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, la aplasia de glóbulos rojos puros (PRCA), deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, citopenias tales como pancitopenia, leucopenia, enfermedades relacionadas con diapédesis leucocitaria, trastorno inflamatorio del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesiones de múltiples órganos como los secundarios a septicemias, traumas o hemorragias, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, motoneuritis, neuritis alérgica, síndrome/enfermedad de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide buloso, penfigoide cicatricial (membrana mucosa), penfigoide dérmico, penfigoide vulgar, penfigoide paraneoplásico, penfigoide foliáceo, pénfigo de membrana mucosa penfigoide y pénfigo eritematoso, epidermólisis bulosa adquirida, inflamación ocular, inflamación ocular preferentemente alérgica tal como conjuntivitis alérgica, enfermedad bulosa IgA linear, inflamación conjuntival inducida y autoinmune, poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica debido a una afección autoinmune, preclampsia, trastorno por inmunocomplejos tal como nefritis por inmunocomplejo, nefritis mediada por anticuerpos, trastornos neuroinflamatorios, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatías IgM o neuropatías con mediación de IgM, trombocitopenia (tal como la desarrollan los pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombótico trombocitopénico (TTP), púrpura postransfusional (PTF), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenias inmunes y autoinmunes incluyendo, por ejemplo, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) incluida PTI crónica o aguda, escleritis tal como queratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios, incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunes, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluyendo tiroiditis tal como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad de tiroides autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, enfermedad ocular de Grave (oftalmopatía u oftalmopatía asociada a las tiroides), síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes, por ejemplo, tipo I (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de rigidez muscular, encefalomielitis tal como encefalomielitis alérgica o encefalomielitis alérgica experimental (EAE), miastenia gravis tal como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclono o síndrome de opsoclono mioclono (SOM) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis tal como neumonitis intersticial linfoide (NIL), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA linear, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis

140

acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis, síndrome enteropático autoinmune, enfermedad celíaca o coelíaca, esprue celíaco (enteropatía por gluten), esprue refractario, esprue idiopático, crioglobulinemia tal como crioglobulinemia mixta, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad del oído autoinmune tal como enfermedad del oído interno autoinmune (EOIA), pérdida auditiva autoinmune, policondritis como policondritis refractaria o recurrente, proteinosis alveolar pulmonar, queratitis tal como síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado al zoster, amiloidosis, linfocitosis no cancerígena, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de las células B monoclonales (por ejemplo, gamapatía monoclonal benigna y gamapatía monoclonal de significancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, focal o segmental, o glomeruloesclerosis focal segmental (GEFS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades de desmielinización tales como enfermedades desmielinizantes y autoinmunes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), esterilidad masculina y femenina autoinmune debido a, por ejemplo, anticuerpos antiespermatozoides, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome de poscardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón del cuidador de aves, angeítis granulomatosa alérgica, angeítis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosa, enfermedad pulmonar intersticial, reacciones de transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tales como leishmaniasis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, acariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdiaca, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, mediastinitis fibrosa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cística, endoftalmitis, eritema elevado diutinum, eritroblastosis fetal, fasciitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, como la ciclitis crónica, la ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica) o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus, sepsis (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes de postvacunación, infección por rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, disfunción gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis postestreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis hipersensible crónica, conjuntivitis, tal como catarro vernal, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión por reperfusión isquémica benigna familiar,

141

reperfusión de órganos transplantados, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad respiratoria obstructiva crónica, silicosis, afta, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos (insuficiencia cerebrovascular) tal como encefalopatía arterioesclerótica y retinopatía arterioesclerótica, aspermiogénesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensoneural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, oftalmitis neonatal, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, timitis linfofolicular, vitiligo, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican infiltración de células T, deficiencia de adhesión leucocitaria, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y recurrente mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, síndrome de lesión orgánica múltiple, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixta, síndrome nefrótico, insulitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmune, incluyendo síndrome poliglandular tipo I, hipoparatiroidismo de inicio en adultos idiopático (HIAI), cardiomiopatía como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bulosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidea, frontal, maxilar o esfenoidea, sinusitis alérgica, trastorno relacionado con los eosinófilos como eosinofilia, eosinofilia por infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma o granulomas con eosinófilos, anafilaxis, espondiloartropatía, espondiloartritis seronegativa, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia temporal de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, angiectasias, trastornos autoinmunes asociados con enfermedades del colágeno, reumatismo como artroreumatismo crónico, linfadenitis, reducción de la respuesta a la presión sanguínea, disfunción vascular, daño tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos por hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno por reperfusión isquémica, lesión por reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, fallo multiorgánico, enfermedades bulosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes granulocíticos asociados a la transfusión, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica sin tratamiento, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis. Estas enfermedades

142

que se consideran en la presente memoria descriptiva se tratan mediante la administración de un anticuerpo que se une a un marcador de la superficie de células B tal como el CD79b e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva también se tratan mediante una terapia combinada que incluye un anticuerpo anti-CD79b o un conjugado de anticuerpo anti-CD79b con fármacos de la invención combinado con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo con fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie.

[0172] El término "tratar", "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en que el objetivo es prevenir o lentificar (disminuir) la afección o trastorno patológico pertinente. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen tanto a las personas que ya tienen un trastorno, como a las que tienen la tendencia a tener el trastorno o que se les debe prevenir tenerlo. Un sujeto o mamífero recibe un "tratamiento" satisfactorio para un cáncer que expresa un polipéptido de CD79b si, tras recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-CD79b según los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o cuantificable o ausencia de uno o más de los siguientes supuestos: reducción de la cantidad de células cancerosas o ausencia de éstas, reducción del tamaño del tumor, inhibición (es decir, lentificación en cierta medida y, preferentemente, detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos, inhibición (es decir, lentificación en cierta medida y, preferentemente, detención) de la metástasis tumoral, inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, alivio en cierta medida de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico en cuestión, reducción de la morbosidad y mortalidad y mejora de la calidad de vida. En función de la capacidad del anticuerpo anti-CD79b para evitar el crecimiento de las células cancerosas existentes y/o destruirlas, puede ser citostático y/o citotóxico. El paciente también puede experimentar una reducción de estos signos o síntomas.

[0173] Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y la mejoría de la enfermedad se pueden medir fácilmente mediante procedimientos habituales conocidos por un médico. En el caso del tratamiento del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (F.F.). La metástasis se puede determinar mediante estudios de diseminación y gammagrafía ósea y pruebas óseas que midan el nivel de calcio y otras enzimas para determinar si se ha extendido al hueso. También se pueden realizar TAC para detectar la extensión a la pelvis y los ganglios linfáticos de la zona. Se utilizan estudios radiológicos de tórax y la medición de los niveles enzimáticos en el hígado mediante métodos conocidos para detectar metástasis en los pulmones y el hígado, respectivamente. Otros métodos habituales para realizar un seguimiento de la enfermedad incluyen ecografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal por punción con aguja gruesa (TRNB).

[0174] Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria por cistoscopia, la supervisión de la

presencia de sangre en la orina, la visualización del tracto urotelial mediante monografía o un pielograma intravenoso, las tomografías asistidas por computadora (TAC) y las imágenes por resonancia magnética (IRM). La presencia de metástasis distantes puede se puede evaluar mediante TAC del abdomen, radiografías torácicas o imágenes radionúclidas del esqueleto.

[0175] Por administración "crónica" se entiende la administración del agente o agentes de un modo continuo, frente a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

[0176] Un "individuo" es un vertebrado. En algunas formas de realización, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen animales de granja (como vacas), animales utilizados en actividades deportivas, animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En algunas formas de realización, el mamífero es un humano.

[0177] Para los propósitos del tratamiento, alivio de los síntomas de un cáncer, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los humanos, los animales domésticos y de granja y los animales utilizados en actividades deportivas, exhibidos en zoológicos y de compañía, como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un humano.

[0178] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[0179] Los "vehículos", tal como se utiliza este término en la presente memoria descriptiva, incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos con las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo con cualidades fisiológicas aceptables es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables están tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes azucarados, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; y/o surfactantes no iónicos, como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

[0180] Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede unir o adherir un anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas englobadas en la presente memoria descriptiva se incluyen aquéllas formadas parcial o completamente por cristal (por ejemplo, cristal poroso controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol de polivinilo y siliconas. En ciertas formas de realización, según el contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una

144

columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente de EE.UU. n.º 4.275.149.

[0181] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco (como un anticuerpo CD79b)a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma se disponen en una formación de doble capa, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

[0182] Por su definición en la presente memoria descriptiva, una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" tiene un peso molecular inferior a 500 daltons.

[0183] Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En algunas formas de realización el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales de granja (como vacas), animales utilizados en actividades deportivas, animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano.

[0184] Por "formulación farmacéutica" se entiende una preparación que, por sus características, permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto a quien se le administraría la formulación. Dicha formulación puede ser estéril.

[0185] Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

[0186] Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo, según se divulga en la presente memoria descriptiva es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y mediante métodos habituales, con respecto al fin expresado.

[0187] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de anticuerpo o de otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas o el tamaño del tumor, inhibir (es decir, aminorar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, la metástasis tumoral y, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición de "tratamiento" en la presente memoria descriptiva. En función de la capacidad del fármaco para prevenir el crecimiento de las células cancerosas existentes y/o destruirlas, el fármaco puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto profiláctico deseado. En general, aunque no necesariamente, dado que una dosis preventiva se utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad eficaz desde el punto de vista preventivo será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0188] Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-CD79b es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, *in*

vitro o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-CD79b a efectos de inhibir el crecimiento celular neoplásico se puede determinar empíricamente y mediante métodos habituales.

[0189] Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-CD79b es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-CD79b a efectos de inhibir el crecimiento celular neoplásico se puede determinar empíricamente y mediante métodos habituales.

[0190] Una "célula que expresa un CD79b" es una célula que expresa un polipéptido CD79b endógeno o transfectado, ya sea en la superficie celular o de forma secretada. Un "cáncer que expresa un CD79b" es un cáncer que contiene células con un polipéptido CD79b presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido CD79b. Un "cáncer que expresa un CD79b" produce niveles suficientes de polipéptido de CD79b en la superficie de sus células, de modo que puede unírsele un anticuerpo anti-CD79b y tener un efecto terapéutico sobre dicho cáncer. En otra realización, un "cáncer que expresa un CD79b" opcionalmente produce y secreta niveles suficientes de polipéptidos CD79b en la superficie de sus células, de modo que un anticuerpo anti-CD79b, un oligopéptido u otra molécula orgánica antagonista pueda unírsele y proporcionarle un efecto terapéutico. Con relación a este último caso, el antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido que reduce, inhibe o previene la producción y secreción del polipéptido CD79b que las células tumorales secretan. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido CD79b es aquél que tiene niveles significativamente superiores de polipéptidos CD79b en la superficie de sus células, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa de la misma clase de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por una amplificación génica o un aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión de los polipéptidos CD79b puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento de los niveles de la proteína CD79b presente en la superficie de una célula, o que la propia célula ha secretado (por ejemplo, a través de un ensayo inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-CD79b preparados para actuar contra un polipéptido CD79b aislado mediante tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido CD79b, o análisis FACS, etc.). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles en la célula del ácido nucleico que codifica el polipéptido CD79b o el ARNm, por ejemplo, a través de hibridación fluorescente *in situ* empleando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifique un CD79b o el complemento del mismo ; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), o las técnicas de "Southern blot", "Northern blot" o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como por ejemplo, la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido CD79b midiendo el antígeno vertido en un fluido biológico como el suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase también la patente de EE.UU. n.º 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990, el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991, la patente de EE.UU. n.º 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995 y Sias y col., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Aparte de los anteriores ensayos, el experto en la materia también dispone de diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se puede exponer células del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente

marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y evaluar la unión del anticuerpo a dichas células, por ejemplo, mediante la exploración externa por radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0191] Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, por "inmunoadhesina" se entienden moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión entre una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que no sea el reconocimiento de un antígeno ni el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La porción de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es, generalmente, una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, como por ejemplo las subclases IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0192] El término "marcador" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto o a una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo de manera de generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de isótopos radioactivos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición sustrato que sea detectable.

[0193] El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa su destrucción. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de estas como nucleolíticenzimas, antibióticos y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de estos y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales divulgados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

[0194] Una "toxina" es una sustancia con capacidad para tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

[0195] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer, independientemente de su mecanismo de acción. Entre las clases de agentes quimioterapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales venenosos, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de las quinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen los compuestos que se utilizan en la "terapia con objetivo" y la quimioterapia convencional. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen:

142

erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracil, 5-fluorouracil, CAS No. 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), cisplatina (cis-diamina,dicloroplatino(II), CAS No. 15663-27-1), carboplatina (CAS No. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo- 2,3,4,6,8-pentazabiciclo [4.3.0] nona-2,7,9-triene- 9-carboxamida, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-*N*,*N*-dimetil-etanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.

[0196] Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatina (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozole (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorin (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (libre de cremóforo), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Il), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas como benzodopa, carboquone, meturedopa y uredopa; etileniminas u metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, triethilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especial,emte bulatacin y bulatacinona); una camptotecina (incluye topotecan sintética análoga); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; spongistatina; mostazas de nitrogen como clorambucil, clornafzina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido hidrocloruro, melfalan, novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimnustina; antibióticos como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gammaII, caliqueamicina omegaII (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, como clodronato; una esperamicina; también cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enadina cromoproteína relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas,

148

cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina, epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como denopterina, metotrexato, teropterina, trimetrexato; análogos de la purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de la pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenérgicos como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; suplemento del ácido fólico como ácido folínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides como maitancina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorrelbina (NAVELBINE®); novantrona; teniposido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; el inhibidor PFS 2000 de la topoisomerasa; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como ácido retinóico; y sales, ácidos y derivados farmacológicamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

[0197] En la definición de "agente quimioterapéutico" también están incluidos: (i) los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores como los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluido, por ejemplo, el tamoxifeno (incluido el citrato de tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y FARESTON (citrato de toremifina); (ii) los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, encargada de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), la formestania, el fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina; así como la troxacitabina (un análogo del nucleócido citosina 1,3-dioxolano); (iv) los inhibidores de proteínas cinasa como los inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) los

149

inhibidores de quinasas lipídicas; (vi) los oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización que intervienen en la proliferación celular anómala, como, por ejemplo, la PKC-alfa, Raf y H-Ras, tal como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) las ribozimas como los inhibidores de la expresión del VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) y los inhibidores de la expresión de HER2; (viii) las vacunas, como vacunas para terapias génicas, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; un inhibidor de la topoisomerasa 1, como LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

[0198] En la definición de "agente quimioterapéutico" también están incluidos los anticuerpos terapéuticos como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia) y el fármaco de conjugado de anticuerpos, gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

[0199] Por "agente inhibidor del crecimiento" se entenderá, en el contexto de la presente memoria descriptiva, un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa el CD79b, *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresan CD79b en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento son los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorrubicina, la epirrubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" ("Regulación del anillo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos") por Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos anticancerígenos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, que ocasiona la inhibición de mitosis en células.

[0200] La "doxorrubicina" es un antibiótico antraciclina. La denominación química completa de la doxorrubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenedione.

150

[0201] El término "citoquina" denomina de forma genérica aquellas proteínas, liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluye la hormona de crecimiento, como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionil y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínicas como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona tiroideo estimulante (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento fibroblástico; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral-α y -β; sustancia muleriano inhibidora; péptido asociado a la gonadotropina murina; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF-β; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento de transformación (TGF), como TGF-α y TGF-β; factor -I y -II de crecimiento similar a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones como interferón -α, -β y -γ; factores estimulantes de la formación de colonias (CSF) como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) como IL-1, IL- 1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral como TNF-α o TNF-ß; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). En la presente memoria descriptiva, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia nativa.

[0202] El término "prospecto" se utiliza para hacer referencia a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos, las cuales contienen información sobre las indicaciones, el uso, la posología, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

[0203] Por "metabolito intracelular" se entiende un compuesto que se deriva de un proceso o reacción metabólicos que se produce en el interior de una célula en un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC). El proceso o reacción metabólico puede ser un proceso enzimático, como escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o hidrolisis de un grupo funcional, como una hidrazona, un éster o una amida. Los metabolitos intracelulares incluyen anticuerpos y fármacos libres que han sufrido escisión intracelular tras entrada, difución, absorción o transporte a una célula.

[0204] Por "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se entiende un proceso o reacción metabólicos en el interior de una célula de un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC) donde se rompe el enlace covalente, es decir, el enlazador, entre el fragmento del fármaco (D) y el anticuerpo (Ab), lo que da lugar a que el fármaco libre se disocie del anticuerpo en el interior de la célula. Los fragmentos escindidos del ADC son, por lo tanto, metabolitos intracelulares.

[0205] Por "biodisponibilidad" se entiende la disponibilidad sistémica (es decir, concentración en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrada a un paciente. El término

biodisponibilidad tiene un carácter absoluto e indica medición tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una dosis administrada.

[0206] El término "actividad citotóxica" se refiere al efecto de destrucción celular, de inhibición del crecimiento o efecto citostático que causa un ADC o en un metabolito intracelular de un ADC. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de IC_{50} que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

[0207] El término "alquilo" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un radical monovalente de hidrocarbono saturado lineal o de cadena ramificada de uno a doce átomos de carbono (C_1–C_{12}), donde el radical alquilo puede sustituirse opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos más adelante. En otra forma de realización, un radical alquilo puede tener de uno a ocho átomos de carbono (C_1–C_8) o de uno a seis átomos de carbono (C_1–C_6). Los ejemplos de los grupos alquilo incluyen, entre otros, metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimetil-2-butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$, 1-heptilo, 1-octilo y similares.

[0208] El término "alquenil" se refiere a un radical monovalente de hidrocarbono lineal o de cadena ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2–C_8) con por lo menos un sitio de insaturación, es decir, carbono-carbono, sp^2 de doble unión, donde el radical alquenilo puede sustituirse opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en esta memoria e incluye a los radicales con orientación "cis" y "trans" o alternativamente, orientación "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, entre otros etilenilo o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$) y similares.

[0209] El término "alquinilo" se refiere a un radical monovalente de hidrocarbono lineal o ramificado de dos a ocho átomos de carbono (C_2–C_8) con por lo menos un sitio de insaturación, es decir, carbono-carbono, sp de triple unión, donde el radical alquinilo puede sustituirse opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en la presente memoria. Entre los ejemplos se encuentran etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargil, $-CH_2C\equiv CH$) y similares.

[0210] Por "carbociclo", "carbociclilo", "anillo carbocíclico" y "cicloalquilo" se entiende un anillo monovalente, no aromático, saturado o parcialmente insaturado de 3 a 12 átomos de carbono (C_3–C_{12}) como anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o

182

[6,6] y los carbociclos bicíclicos de 9 ó 10 átomos en anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6] o como sistemas enlazados por puentes como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Entre los ejemplos de carbociclos monocíclicos se incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares.

[0211] "Arilo" se refiere a un radical hidrocarbono monovalente aromático de 6 a 20 átomos de carbono (C_6–C_{20}) derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un sistema madre de anillo aromático. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como "Ar". El arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o a un anillo aromático carbocíclico. Por lo general, los grupos arilo incluyen radicales obtenidos a partir de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arilo se sustituyen opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en la presente memoria.

[0212] Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva para hacer referencia a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, con uno o más dobles y/o triples enlaces dentro del anillo) de 3 a 20 átomos en anillo, donde al menos un átomo en anillo es un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y sulfuro y demás átomos en anillo son C, donde uno o más átomos en anillo se sustituyen, opcional e independientemente uno de otro, por uno o más de los sustituyentes descritos más adelante. Un heterociclo puede ser un monociclo que contenga de 3 a 7 subunidades en anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo que contenga de 7 a 10 subunidades en anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), especialmente en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, desde 1950 hasta la actualidad), en concreto en los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. El término "heterocíclilo" también incluye radicales en los que los radicales de heterociclo se fusionan con un anillo saturado o parcialmente insaturado o un anillo aromático carbocíclico o heterocíclico. Entre los ejemplos de anillos heterocíclicos se incluyen pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperacinilo, homopiperacinilo, acetidinilo, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabiciclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabiciclo[4.1.0]heptanilo, azabiciclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolil quinolizinil y

N-piridil ureas. En el ámbito de la presente invención también se incluyen porciones espiro. Entre los ejemplos de un grupo heterocíclico donde dos átomos en anillo se sustituyen por porciones oxo (=O) están pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. Los grupos heterociclos se sustituyen opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en la presente memoria.

[0213] Por "heteroarilo" se entiende un radical aromático monovalente de 5-, 6- o 7-subunidades en anillo, e incluye sistemas de anillos fucionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5 a 20 átomos, que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente uno de otro entre nitrógeno, oxígeno y sulfuro. Entre los ejemplos de grupos heteroarilo están piridinilo (incluyendo, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, piracinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolicinilo, ftalacinilo, piridacinilo, triacinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo. Los grupos heteroarilo se sustituyen opcional e independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en la presente memoria.

[0214] Los grupos heterociclos o heteroarilos pueden estar unidos a carbono (enlazado a carbono) o nitrógeno (enlazado a nitrógeno) en los casos en que sea posible. A modo de ejemplo, cabe decir que los heterociclos o heteroarilos con enlace a carbono se enlazan en la posición 2, 3, 4, 5 ó 6 de una piridina;, la posición 3, 4, 5 ó 6 de una piridazina; la posición 2, 4, 5 ó 6 de una pirimidina; la posición 2, 3, 5 ó 6 de una pirazina; la posición 2, 3, 4 ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; la posición 2, 4 ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; la posición 3, 4 ó 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol; la posición 2 ó 3 de una aziridina; la posición 2, 3 ó 4 de una azetidina; la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

[0215] A modo de ejemplo, cabe decir que los heterociclos o heteroarilos con enlace a nitrógeno están enlazados en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol; la posición 2 de un isoindol, o isoindolina; la posición 4 de una morfolina; y la posición 9 de un carbazol, o β-carbolina.

[0216] Por "alquileno" se entiende un radical hidrocarbono saturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alcano padre. Entre los radicales alquilenos típicos, están: metileno ($-CH_2-$) 1,2-etilo ($-CH_2CH_2-$), 1,3-propilo ($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-butilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) y similares.

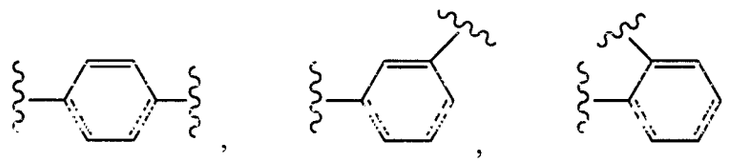
[0217] Un "C_1-C_{10} alquileno" es un grupo de hidrocarbono saturados de cadena recta de fórmula $-(CH_2)_{1-10}-$. Ejemplos de un alquileno C_1-C_{10} son metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

189

[0218] Por "alquenileno" se entiende un radical hidrocarbono insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alqueno padre. Entre los radicales alquenilenos típicos, están: 1,2-etileno (-CH=CH-).

[0219] Por "alquinileno" se entiende un radical hidrocarbono insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alquino padre. Entre los radicales alquinilenos típicos, están: acetileno (-C≡C-), propargilo ($-CH_2C\equiv C-$) y 4-pentinilo ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv C-$).

[0220] Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en configuraciones orto, meta o para, como se muestra en las estructuras siguientes:



en los cuales el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, entre otros, -C_1-C_8 alquilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente del H, -C_1-C_8 alquilo y arilo.

[0221] Por "arilalquilo" se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical arilo. Habitualmente, los grupos arilalquil incluyen bencil, 2-feniletan-1-il, 2-fenileten-1-il, naftilmetil, 2-naftiletan-1-il, 2-naftileten-1-il, naftobencil, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo arilalquil está formada por 1 a 6 átomos de carbono y la porción arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

[0222] Por "heteroarilalquilo" se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquil típicos incluyen 2-benzimidazolilmetil, 2-furiletil y similares, entre otros. El grupo heteroarilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo heteroarilalquil contiene de 1 a 6 átomos de carbono y la fracción heteroaril tiene de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. La fracción heteroaril del grupo hetroarilalquil puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo con 7 a 10 miembros (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

[0223] El término "profármaco" utilizado en esta aplicación se refiere al precursor o a la forma derivativa de un compuesto de la invención que puede ser menos citotóxico para las células en comparación con el compuesto padre o el fármaco y es capaz de activarse enzimática o hidrolíticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, págs. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt y col., (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, entre otros, profármacos con fosfato, profármacos con tiofosfato, profármacos con sulfato, profármacos con péptidos, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactam, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden transformarse en el fármaco más activo no citotóxico. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivados para obtener un profármaco para uso en la presente invención son los compuestos de la invención y los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[0224] Un "metabolito" es un producto obtenido mediante metabolismo en el organismo de un compuesto especificado o de una sal del mismo. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar utilizando técnicas habituales conocidas en el sector y sus actividades se pueden determinar mediante pruebas como las descritas en la presente memoria descriptiva. Estos productos pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y procesos similares del compuesto administrado. Por consiguiente, la presente invención incluye metabolitos de compuestos de la invención, incluidos compuestos producidos mediante un proceso que comprende el establecimiento de un contacto del compuesto de la invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para la obtención del producto metabólico del mismo.

[0225] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma están dispuestos formando dos capas, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

[0226] Por "enlazador" se entiende una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a una fracción de un fármaco. En varias formas de realización, los enlazadores incluyen un radical divalente, como un alquildiil, un arildiil, un heteroarildiil, fracciones como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetidoras de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, Jeffamine™); y amidas y éster diácido, que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

[0227] Por "quiral" se entiende moléculas que tienen la propiedad de no superimposición de la molécula de enlace que constituye la contraimagen, mientras que por "aquiral" se entiende las moléculas que son superponibles a su contraimagen.

[0228] Por "estereoisomeros" se entienden los compuestos que tienen idéntica constitución química pero difieren en la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

[0229] Por "diastereomero" se entiende un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y con moléculas que no son contraimágenes la una de la otra. Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereomeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución, como electroforesis y cromatografía.

[0230] Por "enantiómeros" se entiende dos estereoisomeros de un compuesto que no se superponen como contraimagen el uno del otro.

[0231] Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente memoria descriptiva siguen, por lo general, a S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Existen muchos compuestos orgánicos en formas ópticamente activas, es decir, con capacidad para rotar el plano de la luz polarizada en dicho plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, se utilizan los prefijos D y L, o *R y S*, para denotar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de luz polarizada en el plano por el compuesto, donde (-) o l significan que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, salvo por el hecho de que son imágenes especulares el uno del otro. Un estereoisómero específico también se puede considerar un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia una mezcla enantiomérica. Una mezcla de enantiomeros en una proporción 50:50 se considera una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Por "mezcla racémica" o "racemato" se entiende una mezcla equimolar de dos especies enatioméricas, desprovista de actividad óptica.

[0232] Por "tautómero" o "forma tautomérica" se entiende isómeros estructurales de energías diferentes que son interconvertibles mediante una baja barrera de energía. Por ejemplo, los tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante migración de un protón, como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante reorganización de algunos de los electrones de enlace.

[0233] El término "sal farmacéuticamente aceptable" utilizado en la presente memoria descriptiva hace referencia a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Entre los ejemplos de sales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacharato, formato, benzoato, glutamato, metansulfonato "mesilato", etansulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-

metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede suponer la inclusión de otra molécula como un ión acetato, un ión succinate u otro contraión. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. En caso de que la sal farmacéuticamente aceptable tenga múltiples átomos cargados, dicha sal puede tener múltiples contraiones. Por ello, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

[0234] Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede ser elaborada mediante cualquier método apropiado disponible en el sector, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maléico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidil, como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido hidroxi-alfa, como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

[0235] Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede elaborar mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica, como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metales alcalinos o un hidróxido de metales alcalinotérreos, o similares. Entre los ejemplos de sales apropiadas se incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias o terciarias y aminas cíclicas, como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

[0236] El término "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser compatible química y/o toxicológicamente con los demás componentes de una formulación y/o el mamífero tratado con la misma.

[0237] Por "solvato" se entiende una asociación o complejo de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Entre los ejemplos de disolventes que forman solvatos están agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina. Por "hidrato" se entiende el complejo en el que la molécula de disolvente es agua.

[0238] Por "grupo protector" se entiende un sustituyente que se emplea habitualmente para bloquear o proteger una funcionalidad concreta al tiempo que se hacen reaccionar otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Entre los grupos protectores amino apropiados se incluyen acetil, trifluoroacetil, t-butoxicarbonil (BOC), benciloxicarbonil (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxicarbonil (Fmoc). Del mismo modo, por "grupo protector hidroxi" se entiende un sustituyente de un grupo hidroxi que bloquea o protege la funcionalidad hidroxi. Grupos protectores

apropiados con acetilo y sililo. Por "grupo protector carboxi" se entiende un sustituyente de un grupo carboxi que bloquea o protege la funcionalidad carboxi. Entre los grupos protectores carboxi habituales se incluyen fenilsulfoniletilo, cianoetilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, 2-(p-toluenosulfonil)etil, o 2-(p-nitrofenilsulfenil)etilo, 2-(difenilfosfino)-etilo, nitroetilo y similares. Para una descripción general de los grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

[0239] Por "grupo saliente" se entiende un grupo funcional que se puede sustituir por otro grupo funcional. Determinados grupos salientes son bien conocidos en el sector y entre los ejemplos están un halido (*por ejemplo*, cloruro, bromuro, yoduro), metanesulfonil (mesil), p-toluenesulfonil (tosil), trifluorometilsulfonil (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Abreviaciones

[0240] COMPONENTES DEL ENLAZADOR:

MC = 6-maleimidocaproil

Val-Cit o "vc" = valina-citrulina (un dipéptido ejemplar en un enlazador escindible por una proteasa)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanóico

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

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (donde el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para prevenir su escisión mediante catepsina B)

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

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono-metil auristatina E (MW 718)

MMAF = variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C-terminal del fármaco (MW 731.5)

MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace de amida a la fenilalanina en el extremo C-terminal (MW 801.5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado a la fenilalanina

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

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

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

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

[0241] Otras abreviaturas son: AE significa auristatina E, Boc significa *N*-(*t*-butoxicarbonil), cit significa citrulina, dap significa dolaproina, DCC significa 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM significa diclorometano, DEA significa dietilamina, DEAD significa dietilazodicarboxilato, DEPC significa dietilfosforilcianidato, DIAD significa diisopropilazodicarboxilato, DIEA significa *N,N*-diisopropiletilamina, dil significa dolaisoleucina, DMA significa dimetilacetamida, DMAP significa 4-dimetilaminopiridina, DME significa etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF significa *N,N*-dimetilformamida,

189

DMSO significa dimetilsulfoxido, doe significa dolafenina, dov significa *N,N*-dimetilvalina, DTNB significa *5,5'*-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), DTPA significa ácido dietilenetriaminopentaacético, DTT significa ditiotreitol, EDCI significa 1-(3-dimetilaminopropilo)-3-etilcarbodiimida hidrocloruro, EEDQ significa 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS significa espectrometría de masas de electroaerosol, EtOAc significa etil acetato, Fmoc significa *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly significa glicina, HATU significa *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium hexafluorofosphato, HOBt significa 1-hidroxibenzotriazol, HPLC significa cromatografía líquida de alta presión, ile significa isoleucina, lys significa licina, MeCN (CH_3CH) significa acetonitrilo, MeOH significa metanol, Mtr significa 4-anicildifenilmetilo (o 4-metoxitritil), nor significa (*1S, 2R*)-(+)-norefedrina, PBS significa solución salina tamponada con fosfatos (pH 7.4), PEG significa polietilen glicol, Ph significa fenilo, Pnp significa p-nitrofenilo, MC significa 6-maleimidocaproil, phe significa L-fenilalanina, PyBrop significa bromo *tris*-pirrolidino fosfonio hexafluorofosfato, SEC significa cromatografía de exclusión por tamaño, Su significa succinimida, TFA significa ácido trifluoroacético, TLC significa cromatografía de capa fina, UV significa ultravioleta y val significa valina.

[0242] Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido cisteína diseñado para obtener un anticuerpo progenitor que tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está acoplado a, o a una parte de, un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

[0243] El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona con un reactivo de tiol y se convierte en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona en el 100% del producto con un reactivo de tiol, como por ejemplo un reactivo de biotina-maleimido, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína diseñado en el mismo u otro anticuerpo original que reacciona en el 80% del producto con un reactivo de tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína diseñado para obtener el mismo u otro anticuerpo original que no reacciona en absoluto con un reactivo de tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína determinada puede realizarse mediante ensayo ELISA, espectroscopía de masas, cromatografía líquida, autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas.

[0244] Un "anticuerpo original" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácido a partir de la cual uno o más residuos de aminoácido son sustituidos por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo original puede comprender una secuencia nativa o natural. El anticuerpo original puede tener modificaciones en la secuencia de aminoácidos preexistente (como por ejemplo adiciones, eliminaciones y/o sustituciones) relacionadas con otro anticuerpo nativo o natural u otras formas modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo original puede dirigirse contra un antígeno objetivo de interés, por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos

160

no polipeptídicos (como los antígenos glicolípidos asociados a un tumor; véase la patente de EE.UU. n.º 5091178).

761

Tabla 1

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

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

Tabla 1 (cont.)

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

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

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

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

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

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

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

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

Tabla 1 (cont.)

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 1 (cont.)

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

Tabla 1 (cont.)

...nw

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

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

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

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

...nw

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

Tabla 1 (cont.)

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
                                                        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
                                                        }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
                                                (void) free((char *)col1);                      }
```

Tabla 1 (cont.)

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

#include "nw.h"

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

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

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

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


16B

Tabla 1 (cont.)

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

Tabla 1 (cont.)

...getmat

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

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

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


170

Tabla 1 (cont.)

...pr_align

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

dumpblock

```
dumpblock()
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

Tabla 1 (cont.)

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
```

nums

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

putline

```
putline(ix)
                                        int     ix;                     {
```


172

Tabla 1 (cont.)

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

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

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


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

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

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

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


173

Tabla 1 (cont.)

stripname

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

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

}
```

Tabla 1 (cont.)

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

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

Tabla 1 (cont.)

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
```

g_calloc

```
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
```

readjmps

```
readjmps()
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register  i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

Tabla 1 (cont.)

...readjmps

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


172

Tabla 1 (cont.)

writejmps

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

III. Composiciones y métodos de la invención

[0245] La invención proporciona anticuerpos anti-CD79b o sus fragmentos funcionales y el método de uso en el tratamiento de tumores hematopoyéticos.

[0246] En un aspecto, la invención ofrece un anticuerpo que se une, preferentemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo que incluye el Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv, diacuerpo, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla o anticuerpo que inhiba competitivamente la unión del anticuerpo polipéptido anti-CD79b a su correspondiente epítopo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un maitansinoide, un derivado de dolostatina o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas y, preferentemente, inducir la muerte de una célula a la que se unen. Con fines de detección, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

[0247] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad monovalente del anticuerpo hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento Fab con el CD79b) es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento Fab con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento Fab con el CD79b), que comprende, consiste o consiste esencialmente en secuencia de cadena ligera o pesada de dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0248] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad monovalente del anticuerpo hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento Fab con el CD79b) es menor por lo menos 1, 2 ó 3 veces, que la afinidad monovalente de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento Fab con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento Fab con el CD79b), que comprende, consiste o consiste esencialmente en secuencia de cadena ligera o pesada de dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0249] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad monovalente del anticuerpo hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento Fab con el CD79b) es mayor por lo menos 1, 2 ó 3 veces, que la afinidad monovalente de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento Fab con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento Fab con el CD79b), que comprende, consiste o consiste esencialmente en secuencia de cadena ligera o pesada de

dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0250] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento IgG con el CD79b) es sustancialmente la misma que la afinidad de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento IgG con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento IgG con el CD79b), en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de cadena ligera o pesada de dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0251] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento IgG con el CD79b) es menor, por lo menos 1, 2 ó 3 veces que la afinidad de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento IgG con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento Fab con el CD79b), en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de cadena ligera o pesada de dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0252] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente hacia el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como fragmento IgG con el CD79b) es mayor, por lo menos 1, 2 ó 3 veces, que la afinidad de un anticuerpo de murino (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo de murino como fragmento IgG con el CD79b) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, el anticuerpo quimérico como fragmento Fab con el CD79b), en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de cadena ligera o pesada de dominio variable como se muestra en la Figura 7 (Identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14).

[0253] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 2.0 nM. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 2.0 nM +/- 0.5.

[0254] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 1 nM o mejor. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 1.5 nM o mejor. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b

180

(por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 2 nM o mejor. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 2.5 nM o mejor. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 3 nM o mejor. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 1 nM a 3 nM. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 1.5 nM a 2.5 nM. En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo anti-CD79b humanizado donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente con el CD79b (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo como IgG con el CD79b) es de 1.75 nM a 2.25 nM.

[0255] En un aspecto, la afinidad monovalente del anticuerpo murino hacia el CD79b es sustancialmente la misma que la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias de dominio variable de identificador de secuencia n.º: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B). En otro aspecto, la afinidad monovalente del anticuerpo murino con el CD79b es sustancialmente la misma que la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias de dominio variable generadas de hibridomas depositados en el ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006 o anticuerpos quiméricos que comprenden dominios variables de anticuerpos generados de hibridomas depositados en el ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

[0256] Como es bien sabido en este campo, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando uno de los diversos ensayos existentes y se puede expresar en función de diversos valores cuantitativos. Por ello, en una forma de realización, la afinidad de unión se expresa como valores Kd y refleja una afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidez minimizados). Por lo general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, tanto en un entorno sin células, como en uno asociado con células. Como se describe detalladamente en la presente memoria descriptiva, el número de veces en que se diferencia la afinidad de unión se puede cuantificar en función de la proporción entre el valor de la afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma Fab) y el valor de la afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/de control (por ejemplo, en forma Fab) (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias de la región hipervariable del donante), donde los valores de la afinidad de unión se determinan en condiciones de ensayo similares. De este modo, en una forma de realización, esta diferencia de la afinidad de unión en número de veces se determina como la proporción entre los valores Kd del anticuerpo humanizado en forma Fab y el anticuerpo Fab de referencia/de control. Por ejemplo, en una forma de realización, si un anticuerpo de la invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces, si el valor Kd para A es 3x, el valor Kd de M sería 1x y la proporción entre el Kd de A y el Kd de M sería 3:1.

781

En cambio, en una forma de realización, si un anticuerpo de la invención (C) tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces, si el valor Kd para C es 1x, el valor Kd de R sería 3x y la proporción entre el valor Kd de C y el valor Kd de R sería 1:3. Se puede utilizar cualquiera de los diversos ensayos conocidos en la materia, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva, para obtener mediciones de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

[0257] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al CD79b, donde el anticuerpo comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º 59)

(ii)HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNQKFKD (identificador de secuencia n.º: 63) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F10 es ARNLYL (identificador de secuencia n.º: 64).

En una forma de realización, la HVR-L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 59. En una forma de realización, la HVR-L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 60. En una forma de realización, la HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 61. En una forma de realización, la HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 62. En una forma de realización, la HVR-H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 63. En una forma de realización, la HVR-H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 64. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación, como se describe en la presente memoria descriptiva) es humano o humanizado.

[0258] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al CD79b, donde el anticuerpo comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas en el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º 59)

182

(ii)HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYTHHFKD (identificador de secuencia n.º: 63) y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F10 es ARNLYL (identificador de secuencia n.º: 64); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la secuencia de la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia n.º: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64. En una forma de realización, la HVR-L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 59. En una forma de realización, la HVR-L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 60. En una forma de realización, la HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 61. En una forma de realización, la HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 62. En una forma de realización, la HVR-H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 63. En una forma de realización, la HVR-H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 64. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación, como se describe en la presente memoria descriptiva) es humano o humanizado.

[0259] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada entre el grupo formado por los identificadores de secuencia n.º: 59, 60, 61, 62, 63 y 64, y donde el identificador de secuencia n.º: 59 corresponde a un HVR-L1, identificador de secuencia n.º: 60 corresponde a HVR-L2, identificador de secuencia n.º: 61 corresponde a un HVR-L3, identificador de secuencia n.º: 62 corresponde a un HVR-H1, identificador de secuencia n.º: 63 corresponde a un HVR-H2, identificador de secuencia n.º: 64 corresponde a un HVR-H3. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, donde cada una de ellas, por orden, comprende los identificadores de secuencia n.º: 59, 60, 61, 62, 63 y 64.

[0260] Las variantes de las HVR en un anticuerpo de una invención pueden tener modificaciones en uno o más residuos dentro de la HVR. En una forma de realización, una variante de la HVR-L3 comprende 1-2 (1 ó 2) sustituciones en cualquier combinación de las posiciones siguientes: C1 (F) y C8 (F). La letra o letras entre paréntesis que siguen a cada posición indican un aminoácido utilizado como sustitución (es decir, reemplazo) a modo de ejemplo; como los expertos en la materia saben, la idoneidad de otros aminoácidos para su uso como aminoácidos de sustitución en el contexto expuesto en la presente

183

memoria descriptiva se puede evaluar empleando técnicas conocidas en la materia o descritas en esta memoria. En una forma de realización, C1 en una variante de HVR-L3 es F. En una forma de realización, C8 en una variante HVR-L3 es F. En una forma de realización un anticuerpo de la invención comprende una variante de HVR-L3 donde C1 es F y C8 es F.

[0261] En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de HVR-L3 donde C1 es F. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de HVR-L3 donde C8 es F. En algunas formas de realización , dicha variante del anticuerpo HVR-L3 comprende también HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 donde cada uno comprende, por orden, la secuencia que se muestra en el identificadores de secuencia n.º: 59, 60, 62, 63 y 64. En algunas formas de realización, estos anticuerpos comprenden también una secuencia de la estructura de consenso humana de la cadena pesada del subgrupo III. En una forma de realización de estos anticuerpos, la estructura de la secuencia de consenso comprende la sustitución en las posiciones 71, 73 y/o 78. En algunas formas de realización de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y 78 es A. En algunas formas de realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de la estructura de consenso humana de cadena ligera del subgrupo κI.

[0262] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende la secuencia HVR que se muestra en la Figura 9 (identificador de secuencia n.º: 18).

[0263] Un agente terapéutico para su uso en un huésped preferentemente que no provoque respuesta inmunogénica o que provoque escasa respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En una forma de realización, la invención proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que provoca y/o se prevé que provoque una respuesta del anticuerpo antimurino humano (HAMA) en un nivel sustancialmente menor que la de un anticuerpo que comprende la secuencia de identificador de secuencia n.º: 10 y 14 en un huésped. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que provoca y/o se prevé que provoque una respuesta mínima o ninguna respuesta del anticuerpo antiratón humano (HAMA). En otro ejemplo, un anticuerpo de la invención provoca una respuesta al anticuerpo antiratón que es igual o menor a la respuesta clínicamente aceptable.

[0264] Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias humanas y/o de consenso humanas (por ejemplo, de estructura) que no sean de la región hipervariable en su dominio variable de la cadena pesada y/o ligera. En algunas formas de realización, están presentes una o más modificaciones adicionales dentro de las secuencias humanas y/o de consenso humanas que no sean de la región hipervariable. En una forma de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de la estructura de consenso humana, que, en una forma de realización, es la secuencia de la estructura de consenso del subgrupo III. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia de la estructura de consenso del subgrupo III modificada por lo menos en la posición de un aminoácido. Por ejemplo, en una forma de realización, una variante de la secuencia de la estructura de consenso del subgrupo III puede

184

comprender una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y/o 78. En una forma de realización dicha sustitución es R71A, N73T y/o N78A, en cualquier combinación de ellas.

[0265] Como es bien sabido en la materia, y como se describe en mayor detalle más adelante, el límite/la posición de los aminoácidos que delinean una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de las diversas definiciones conocidas en la materia (como se describe más adelante). Algunas posiciones dentro de un dominio variable se pueden considerar posiciones hipervariables híbridas, en el sentido de que se puede considerar que estas posiciones están dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios, mientras que se considera que están fuera de una región variable según un conjunto de criterios distintos. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en regiones hipervariables ampliadas (entendiendo estas como se definen más adelante). La invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una forma de realización, estas posiciones hipervariables incluyen una o más de las posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 y 101-102 en un dominio variable de la cadena pesada. En una forma de realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 56 y 97 en un dominio variable de la cadena ligera. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia de la estructura de consenso humana de un subgrupo, modificada en una o más posiciones hipervariables híbridas.

[0266] En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene una variante de la secuencia de la estructura de consenso humana del subgrupo III modificada en una o más de las posiciones 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 y 101.

[0267] En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene una variante de la secuencia de la estructura de consenso kappa humana del subgrupo I modificada en una o más de las posiciones 24, 27-29, 56 y 97.

[0268] En un aspecto, un anticuerpo de la invención contiene un dominio variable de la cadena pesada que contiene una variante de la secuencia de la estructura de consenso human del subgrupo III modificada en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o en todas las posiciones 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 y 101. En algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia de la estructura de consenso del subgrupo III modificada en la posición 71, 73 y/o 78. En una forma de realización, dicha sustitución es R71A, N73T y/o L78A.

[0269] En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene una variante de la secuencia de la estructura de consenso kappa humana del subgrupo I modificada en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5 o en todas las posiciones 24, 27-29, 56 y 97.

[0270] Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier secuencia de la estructura de consenso humana o humana conveniente de la cadena ligera, siempre que el anticuerpo presente las características biológicas deseadas (por ejemplo, la afinidad de unión deseada). En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende al menos una porción (o todas) de la secuencia de la estructura de la cadena ligera κ humana. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención

185

comprende al menos una porción (o la totalidad) de la secuencia de la estructura de consenso humana κ del subgrupo I.

[0271] En un aspecto, un anticuerpo de la invención contiene un dominio variable de la cadena pesada o ligera que contiene la secuencia de la estructura que se muestra en identificador de secuencia n.°: 9 (Figura 7) y/o 13 (Figuras 8A-B).

[0272] En un aspecto, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado anti-CD79b conjugado con un agente citotóxico. En un aspecto, el anticuerpo humanizado anti-CD79b conjugado con un agente citotóxico inhibe el progreso del tumor en modelos xenotrasplantados.

[0273] En un aspecto, tanto el anticuerpo humanizado como el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una forma de realización, tanto el anticuerpo humanizado como el quimérico comprenden una única región Fab unida a una región Fc. En una forma de realización, el anticuerpo quimérico de referencia comprende las secuencias de dominio variable que se muestran en la Figura 7 (identificador de secuencia n.°: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.°: 14) enlazado a una región Fc humana. En una forma de realización, la región Fc humana es la de una IgG (por ejemplo, IgG1, 2, 3 ó 4).

[0274] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.°: 31-33). En una forma de realización, el dominio variable comprende una secuencia de FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC mostrada en la Figura 13. (identificador de secuencia n.°: 27-30). En una forma de realización el anticuerpo comprende la secuencia CH1 y/o Fc que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.°: 34-35). En una forma de realización un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, identificador de secuencia n.°: 31-33) y una secuencia de FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC (Figura 13, identificador de secuencia n.°: 27-30). En una forma de realización un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, identificador de secuencia n.°: 31-33) y la secuencia CH1 y/o Fc que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.°: 34-35) En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC (Figura 13, identificador de secuencia n.°: 31-33) y la secuencia FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC (Figura 13, identificador de secuencia n.°:27-30), así como CH1 y/o Fc (Figura 13, identificador de secuencia n.°: 34-35).

[0275] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.°: 23-25). En una forma de realización, el dominio variable comprende una secuencia de la FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC mostrada en la Figura 13. (identificador de secuencia n.°: 19-22). En una forma de realización el anticuerpo comprende la secuencia CL1 que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.°: 26). En una forma de realización, el

anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (identificador de secuencia n.º: 23-25) y la secuencia de FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC (identificador de secuencia n.º: 19-22) mostrada en la Figura 13. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (identificador de secuencia n.º: 23-25), y la secuencia CL1 (identificador de secuencia n.º: 26) que se muestra en la Figura 13. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene la secuencia HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC (identificador de secuencia n.º: 23-26 y la secuencia FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC (identificador de secuencia n.º: 19-22) que se muestra en la Figura 13, y la secuencia CL1 que se muestra en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 26).

[0276] En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos diseñados con cisteína en donde se reemplazan uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental con un aminoácido de cisteína libre, tal como se describe en el documento WO2006/034488; EE.UU. 2007/0092940 (íntegramente incorporado en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Cualquier forma de anticuerpo anti-CD79b puede diseñarse de esta manera, es decir, puede mutarse. Por ejemplo, un fragmento Fab de un anticuerpo original puede diseñarse para formar un Fab diseñado con cisteína, denominado "ThioFab" en la presente memoria descriptiva. Del mismo modo, un anticuerpo monoclonal original se puede diseñar para formar un "ThioMab". Se debería tener en cuenta que una mutación en un único sitio produce un solo residuo diseñado con cisteína en un ThioFab, mientras que una mutación en un único sitio produce dos residuos diseñados con cisteína en un ThioMab. Esto se debe a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que preferentemente unen polipéptidos CD79b asociados a las células. Un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender alternativamente un anticuerpo que contenga una cisteína en el anticuerpo o Fab, con una posición detallada en la presente memoria descriptiva, que se obtiene del diseño o selección, o ambos, de la secuencia del anticuerpo, sin necesariamente alterar un anticuerpo parental, como por ejemplo, mediante un diseño y selección de anticuerpos presentados en fagos o a través de un diseño nuevo de secuencias estructurales y regiones constantes de la cadena ligera o pesada, o ambas. Un anticuerpo diseñado con cisteína comprende uno o más aminoácidos sin cisteína con un valor de reactividad del tiol en un rango de entre 0,6 y 1,0; 0,7 y 1,0 ó 0,8 y 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que se ha diseñado en anticuerpo parental y no forma parte de un enlace disulfuro. Los anticuerpos diseñados con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos o de imágenes, o ambos, en una posición de la cisteína diseñada mediante, por ejemplo, una maleimida o un haloacetil. La reactividad nucleófila de la funcionalidad del tiol de un residuo de Cys con un grupo maleimido es aproximadamente 1.000 veces mayor que cualquier otra funcionalidad aminoacídica de una proteína, como por ejemplo, el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino del extremo N terminal. La funcionalidad del tiol específica en los reactivos yodoacetilos y maleimidos puede reaccionar con

grupos aminos, sin embargo, se requieren tiempos de reacción mayores y niveles de pH superiores (>9,0) (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres).

[0277] En un aspecto un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína de la invención comprende una cisteína diseñada en cualquiera de las siguientes posiciones, donde la posición está numerada según Kabat y col. en la cadena ligera (véase Kabat y col (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y según la numeración EU de la cadena pesada (incluida la región Fc) (véase Kabat y col. (1991), mencionado anteriormente), donde la región constante de cadena ligera que se muestra subrayada en las Figuras 17A y 18A inicia en la posición 109 (numeración de Kabat) y la región constante de la cadena pesada que se muestra subrayada en las Figuras 17B y 18B inicia en la posición 118 (numeración EU). También se puede hacer referencia por su posición en la numeración secuencial de los aminoácidos de la cadena ligera o pesada completa que se muestran en las Figuras 17-18. De acuerdo con una realización de la invención un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína diseñada en LC-V205C (número de Kabat: Val 205; número secuencial 210 en la Figura 18A diseñado para que sea Cys en esa posición). La cisteína diseñada en la cadena ligera se muestra en un texto en negrita con doble subrayado en la Figura 18A. Según una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína diseñada en HC-A118C (número EU: Ala 118; número Kabat 114; número secuencial 118 en la Figura 17B diseñado para que sea Cys en esa posición). La cisteína diseñada en la cadena pesada se muestra en un texto en negrita con doble subrayado en la Figura 17B. Según una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende una cisteína diseñada en Fc-S400C (número EU: Ser 400; número Kabat 396; número secuencial 400 en la Figura 17-18B diseñado para que sea Cys en esa posición). En otras formas de realización, la cisteína diseñada de la cadena pesada (incluyendo la región Fc) se encuentra en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración de Kabat con la numeración EU entre paréntesis): 5, 23, 84, 112, 114 (118 numeración EU), 116 (120 numeración EU), 278 (282 numeración EU), 371 (375 numeración EU) o 396 (400 numeración EU). Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b parental de la invención son: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C numeración EU), T116C (T120C numeración EU), V278C (V282C numeración EU), S371C (S375C numeración EU) o S396C (S400C EU numeración EU). Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo quimérico anti-CD79b de la invención son: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C numeración EU), T116C (T120C numeración EU), V278C (V282C numeración EU), S371C (S375C numeración EU) o S396C (S400C EU numeración EU). En otras formas de realización, la cisteína diseñada de la cadena ligera se encuentra en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración de Kabat): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD79b parental de la invención son: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, o V205C. Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo quimérico anti-CD79b de la invención son: I15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, o V205C.

[0278] En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libres, donde el anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína se une a un polipéptido de CD79b y se prepara por un proceso que incluye remplazar uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína donde el anticuerpo parental comprende por lo menos una secuencia HVR seleccionada de:

(a) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A15, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.°: 59)

(b)HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.°: 60)

(c) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.°: 61) o FQGTHFPFT (Identificador de secuencia n.°: 79)

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.°: 62)

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (identificador de secuencia n.°: 63) y

(f) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F10 es ARNLYL (identificador de secuencia n.°: 64).

[0279] En cierto aspecto, la invención comprende un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína que contiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de homología de la secuencia de los aminoácidos, alternativamente, al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo diseñado con cisteína con secuencia de aminoácidos de longitud completa según se describe en la presente memoria o una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo diseñado con cisteína carente de un péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

[0280] En un segundo aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD79b aislado diseñado con cisteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que se hibridiza con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo diseñado con cisteína con una secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (b) una secuencia de aminoácidos del anticuerpo diseñado con cisteína carente de un péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (c) un dominio extracelular de una proteína transmembrana del anticuerpo diseñado con cisteína, con el péptido de señal o sin él, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (d) una secuencia de aminoácidos que se codifica mediante cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo diseñado con cisteína de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

[0281] En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b aislado diseñado con cisteína sin la secuencia de señal N-terminal ni la metionina inicial, y se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Los procesos para producir dicho anticuerpo también se detallan en la presente memoria descriptiva, en donde los procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que contiene un vector con la correspondiente molécula de ácido nucleico de codificación bajo las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína, y la recuperación del anticuerpo diseñado con cisteína del cultivo celular.

[0282] Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b aislado diseñado con cisteína que es un transmembrana con dominio eliminado o inactivo. Los procesos para producir dicho anticuerpo también se detallan en la presente memoria descriptiva, comprendiendo el cultivo de una célula anfitrión con un vector que contiene la correspondiente molécula de ácido nucleico de codificación bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína, y la recuperación del anticuerpo diseñado con cisteína del cultivo celular.

[0283] En otros aspectos de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD79b quiméricos aislados diseñados con cisteína que comprenden cualquiera de los anticuerpos diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva, fusionados a un polipéptido heterólogo (no CD79b). Un ejemplo de dichas moléculas quiméricas comprende cualquiera de los anticuerpos diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva, fusionados a un polipéptido heterólogo tal como una secuencia de marca de epítopo o una región Fc de una inmunoglobulina.

[0284] El anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhiba competitivamente la unión del anticuerpo polipéptido anti-CD79b a su correspondiente epítopo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un maitansinoide, un derivado de dolostatina o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas y, preferentemente, inhiben el crecimiento o la proliferación, o bien inducen la muerte, de una célula a la que se unen. Con fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

[0285] En otros aspectos de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden el ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b y anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva. También se proporcionan células anfitrión que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células anfitrión pueden ser de CHO, E. coli o levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los

190

polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células anfitrión bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y su recuperación del cultivo celular.

[0286] Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluir anticuerpos específicos para la superficie celular y los receptores transmembranales, y antígenos asociados al tumor (AAT). Estos anticuerpos pueden utilizarse como anticuerpos desnudos (no conjugados con una fracción de fármacos o marcas) o como anticuerpos conjugados con fármacos (ADC). Los anticuerpos de la invención diseñados con cisteína pueden unirse eficazmente y en un sitio específico con un reactivo del tiol. El reactivo del tiol puede ser un reactivo del enlazador multifuncional, un reactivo de marcador de captura, un reactivo fluoróforo o un enlazador a fármaco intermedio. El anticuerpo diseñado con cisteína puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en un soporte de fase sólida y/o conjugarse con una fracción de un fármaco. La reactividad del tiol puede generalizarse en cualquier anticuerpo, donde la sustitución de aminoácidos por aminoácidos de cisteínas reactivas puede realizarse dentro de los rangos en la cadena ligera seleccionados a partir de los rangos de aminoácidos: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210 y dentro de los rangos de la cadena pesada seleccionada de los rangos de aminoácidos: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121 y la región Fc dentro de los rangos seleccionados de H270-H280, H366-H376, H391-401, donde la numeración de la posición de los aminoácidos inicia en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y en adelante continúa secuencialmente según se detalla en WO2006034488; EE.UU. 2007/0092940. la reactividad del tiol también se puede generalizar para ciertos dominios de un anticuerpo, como el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteínas que producen como resultado los valores de reactividad del tiol de 0,6 y mayores pueden realizarse en los dominios constantes de la cadena pesada α, δ, ε, γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Estos anticuerpos y sus usos se describen en el documento WO2006/034488; EE.UU. 2007/0092940.

[0287] Los anticuerpos de la invención diseñados con cisteína conservan preferentemente la capacidad de unión al antígeno de los homólogos anticuerpos parentales de tipo natural. Por lo tanto, los anticuerpos diseñados con cisteína son capaces de unirse, preferiblemente de forma específica, a antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (AAT), proteínas de los receptores de superficie celular y otras moléculas de superficie celular, proteínas transmembranas, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas al desarrollo o diferenciación ticular (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional al mismo), linfoquinas, citoquinas, moléculas que intervienen en la regulación del ciclo celular o en la vasculogénesis y moléculas asociadas a la angiogénesis (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional a la misma). El antígeno asociado al tumor puede ser un factor de diferenciación de grupos (es decir, una proteína CD, incluyendo, entre otras, la

191

CD79b). Los anticuerpos anti-CD79b de la invención diseñados con cisteína conservan la capacidad de unión al antígeno de sus homólogos anticuerpos parentales anti-CD79b. Por ende, los anticuerpos anti-CD79b de la invención diseñados con cisteína son capaces de unirse específica y preferentemente a los antígenos CD79b, incluyendo las isoformas anti-CD79b humanas beta o alfa, o ambas; aún cuando dichos antígenos se expresan en la superficie celular, incluyendo, entre otras, las células B.

[0288] En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con cualquier grupo de marcas que pueda unirse covalentemente al anticuerpo a través de un grupo reactivo, un grupo activo o un grupo tiol de cisteína reactivo (Singh y col., (2002) Anal. Biocham. 304:147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2.ª ed. CRC Press, Boca Raton, FL). El marcador unido puede: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable que proporcionó la primera o la segunda marca, por ejemplo, para brindar FRET (transferencia resonante de energía de fluorescencia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de unión con un antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, como por ejemplo, la movilidad electroforética o la permeabilidad celular mediante la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos; o (v) proporcionar el grupo de captura para modular la afinidad del ligando, la unión antígeno-anticuerpo o la formación de complejos iónicos.

[0289] Los anticuerpos diseñados con cisteína y marcados pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o sueros específicos. Para las aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo generalmente se marcará con un grupo detectable. Se dispone de numerosas marcas que pueden agruparse, por lo general, en las siguientes categorías:

[0290] Los radioisótopos (radionúclidos), tales como ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, o ^{213}Bi. Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en los experimentos de diagnóstico por imágenes que actúan sobre el receptor. Los anticuerpos puede marcarse con reactivos ligandos que unen agentes quelantes de metales u otros complejos para el radioisótopo, donde el agente es reactivo con el tiol diseñado con cisteína del anticuerpo, mediante las técnicas que se describen en Current Protocols in Immunology, Volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden combinar un ión metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Se puede actuar sobre los radionúclidos a través de la formación de complejos con anticuerpos de la invención conjugados con fármacos (Wu y col. (2005), Nature Biotechnology 23(9):1137-1146).

[0291] Los reactivos enlazadores tales como el maleimido-DOTA (4-maleimidobutiramidobenzilo-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción del aminobencilo-DOTA con el ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con formatocloroisopropil (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy y col., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807). Los agentes reactivos maleimido-DOTA reaccionan con los aminoácidos de cisteína libre de los anticuerpos diseñados

con cisteína y proporcionan un ligando de formación de complejos de metal en el anticuerpo (Lewis y col. (1998), Bioconj. Chem. 9:72-86). Los reactivos de marcación con enlazadores quelantes tales como DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-monoácido tetraacético (éster de N-hidroxisuccinimida) se encuentran comercialmente disponibles (Macrocyclics, Dallas, TX). La imagen que actúa sobre el receptor con los anticuerpos marcados con radionucleidos puede proporcionar un marcador de una vía de activación mediante la detección y cuantificación de la acumulación progresiva de anticuerpos en el tejido tumoral (Albert y col., (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación lisosomal.

[0292] Los complejos quelantes metálicos que sirven como marcadores de anticuerpos para los experimentos de diagnóstico por imágenes se describen en: EE.UU. 5342606; EE.UU. 5428155; EE.UU. 5316757; EE.UU. 5480990; EE.UU. 5462725; EE.UU. 5428139; EE.UU. 5385893; EE.UU. 5739294; EE.UU. 5750660; EE.UU. 5834456; Hnatowich y col., (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157; Meares y col., (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh y col., (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares y col., (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26; Izard y col., (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula y col., (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera y col., (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis y col., (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel y col., (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera y col., (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg y col., (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel y col., (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee y col., (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell y col., (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi y col., (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer y col., (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo y col., (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend y col., (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula y col., (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi y col., (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian y col., (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli y col., (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

[0293] Los marcadores fluorescentes tales como los quelantes térreos (quelantes europios) poco frecuentes, los tipos fluoresceína, que incluyen FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; los tipos rodamina, que incluyen TAMRA; dancil; lisamina; cianinas; ficoeritrina; Rojo Texas y los análogos de los mismos. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con anticuerpos mediante las técnicas que se describen, por ejemplo, en Protocols in Immunology, mencionado anteriormente. Los reactivos de tintes y marcadores fluorescentes incluyen aquellos que se encuentran comercialmente disponibles de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

[0294] Se encuentran disponibles o se describen diversos marcadores de sustratos de enzimas (patente de EE.UU. n.º 4275149). Por lo general, la enzima cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia de un sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminescente se excita electrónicamente mediante una reacción química y, entonces, puede emitir luz que puede medirse

193

(mediante un quimioluminómetro, por ejemplo) o puede donar energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas (como por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Techniques for conjugating enzymes to antibodies are described in O'Sullivan y col (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

[0295] Los ejemplos de combinaciones de sustratos de enzimas incluyen, por ejemplo:

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

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con paranitrofenilfosfato como un sustrato cromogénico; y

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

[0296] Se encuentran disponibles muchas otras combinaciones de sustratos de enzimas para aquellos expertos en la materia. Para obtener una revición general, véanse las patentes de EE.UU. 4275149 y 4318980.

[0297] Una marca puede conjugarse de manera indirecta con una cadena lateral de aminoácidos, una cadena lateral de aminoácidos activada, un anticuerpo diseñado con cisteína, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la estreptavidina y, de este modo, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador con una variante del polipéptido, la variante del polipéptido se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante del polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante del polipéptido (Hermanson, G. (1996) en Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego).

[0298] El anticuerpo de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido tales como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos tipo "sándwich" directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág.147-158, CRC Press, Inc.).

[0299] Un marcador de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar una unión o un evento de reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores de

superficie celular Otro uso de los anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en partículas que comprende la conjugación de una partícula con un anticuerpo fluorescente marcado y la detección de una señal fluorescente sobre la unión de un ligando. Métodos similares de detección de uniones utilizan el efecto de la resonancia plasmón de superficie (FPS) para medir y detectar las interacciones entre anticuerpos y antígenos.

[0300] Las marcas de detección, como por ejemplo, los tintes fluorescentes y quimioluminescentes (Briggs y col., (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058), proporcionan una señal detectable y por lo general, se aplican en los anticuerpos marcados, preferentemente en aquellos que tienen las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal muy alta con un entorno bajo para que las pequeñas cantidades de anticuerpos puedan detectarse sensiblemente tanto en los ensayos con células como en aquellos sin células; y (ii) el anticuerpo marcado debe ser fotoestable para que la señal fluorescente pueda observarse, controlarse y registrarse sin un fotoblanqueamiento significativo. Para las aplicaciones que implican una unión en la superficie celular del anticuerpo marcado a las membranas o superficies celulares, especialmente células vivas, los marcadores preferentemente (iii) deben tener una buena solubilidad en agua para lograr una concentración de conjugado y una sensibilidad de detección eficaces y (iv) no deben ser tóxicas para las células vivas para no alterar los procesos metabólicos normales de las células ni causar la muerte prematura de éstas.

[0301] La cuantificación directa de la intensidad de la fluorescencia celular y la enumeración de los eventos marcados fluorescentemente, como por ejemplo, la unión en la superficie celular de los conjugados de tinte peptídico, pueden realizarse en un sistema (Sistema FMAT® 8100 HTS, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza la mezcla y lectura de los ensayos no radiactivos con células vivas o partículas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204). Los usos de los anticuerpos marcados también incluyen los ensayos de unión del receptor de superficie celular, los ensayos de inmunocaptura, los ensayos de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA), la escisión de la caspasa (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; EE.UU. 6372907), la apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) y ensayos citotóxicos. La tecnología de ensayos de microvolumen fluorométrico puede utilizarse para identificar las regulaciones a la alza y a la baja mediante una molécula que actúa sobre la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51).

[0302] Los anticuerpos marcados de la invención son útiles como biomarcadores de diagnóstico por imágenes y sondas que se utilizan en los distintos métodos y técnicas de diagnóstico por imagen

195

biomédica y molecular, tales como: (i) MRI (imágenes obtenidas mediante reconancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computarizada); (iii) SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía con emición de positrones) Chen y col., (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia y (vii) ultrasonido. La inmunoscintigrafía es un procedimiento de diagnóstico por imágenes en el que los anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o a un paciente humano y se obtiene una fotografía de los lugares del cuerpo donde se localizan dichos anticuerpos (patente de EE.UU. 6528624). Los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Existen diferentes tipos de biomarcadores: Los Tipo 0 son marcadores de la evolución de una enfermedad y están correlacionados longitudinalmente con índices clínicos conocidos, como por ejemplo, la valoración por MRI de la inflamación sinovial en la artritis reumatoide; los marcadores Tipo I capturan el efecto de una intervención de acuerdo con un mecanismo de acción, inclusive si el mecanismo no está relacionado con el resultado clínico; los marcadores Tipo II funcionan como puntos de valoración alternativos en donde el cambio o la señal del biomarcador pronostica un beneficio clínico para "validar" la respuesta objetiva, como por ejemplo, una erosión ósea que mide la tomografía computarizada en la artritis reumatoide. Por lo tanto, los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FD) sobre: (i) la expresión de una proteína diana, (ii) la unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, la selectividad, y (iii) los datos de eliminación y semivida farmacocinética. Las ventajas de los biomarcadores de imágenes in vivo con respecto a los biomarcadores basados en el laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificación, evaluación de todo el cuerpo, evaluaciones y dosis repetitivas, es decir, muchos momentos específicos, y transferencia potencial de efectos preclínicos (en animales pequeños) a resultados clínicos (en humanos). Para algunas aplicaciones, la bioimagen sustituye o minimiza la cantidad de experimentos realizados en animales en estudios preclínicos.

[0303] Los métodos de marcado con péptidos son bien conocidos. Véase Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres, Means (1990), Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer y col. (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I y II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin y New York; y Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez y col., (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis y col., (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li y col., (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier y col., (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237.

[0304] Los péptidos y las proteínas marcados con dos fracciones, un indicador fluorescente y uno de absorción lo suficientemente cerca entre sí experimentan la transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET). Por lo general, los grupos de indicadores son tintes fluorescentes que se excitan mediante la luz a una longitud de onda determinada y transfieren la energía a un grupo de aceptores o absorbentes con el cambio Stokes adecuado para producir la emición con un brillo máximo. Los tintes fluorescentes incluyen moléculas con una aromaticidad extendida tal como la fluoresceína y la rodamina y sus derivados. La fracción absorbente en un péptido intacto puede absorber parcial o completamente el indicador fluorescente. Cuando la peptidasa o la protasa producen la escisión de un péptido, puede medirse un aumento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34).

[0305] Los anticuerpos marcados de la invención también pueden utilizarse como un agente para la purificación por afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza en un soporte sólido, como una resina Saphadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la materia. El anticuerpo inmovilizado entra en contacto con una muestra que contiene el antígeno que deberá purificarse y, a continuación, el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra, excepto el antígeno que se purificará y que está unido a la variante polipeptídica inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado tal como el tampón glicina, pH 5.0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

[0306] Los reactivos de marcación tienen generalmente una funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de un anticuerpo diseñado con cisteína para formar un anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un enlazador marcado intermedio o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar un anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de los reactivos de marcación incluye: maleimido, haloacetil, éster succinimidil iodoacetamida (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro sulfonil, 2,6-diclorotriazinil, éster pentafluorofenil y fosforamidita, a pesar de que también pueden utilizarse otros grupos funcionales.

[0307] Un grupo funcional reactivo ejemplar es el éster N-hidroxisuccinimidil (NHS) de un grupo carboxilo que sustituye un marcador detectable, por ejemplo, una biotina o un tinte fluorescente. El éster NHS del marcador puede preformarse, aislarse, purificarse o caracterizarse, o todos los anteriores, o bien puede formarse in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Por lo general, la forma carboxilo del marcador se activa cuando reacciona con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, como por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, como por ejemplo, TSTU (O-(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato, HBTU (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para proporcionar el éster NHS del marcador. En algunos casos, el marcador y el anticuerpo deben acoplarse mediante la activación del marcador in situ y reaccionar con el anticuerpo para formar el conjugado de anticuerpo y marcador en un paso. Otros reactivos

de activación y acoplamiento incluyen TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1-1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), TFFH (N,N',N",N'"-tetrametiluronio 2-fluoro-hexafluorofosfato), PyBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato, EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo y arilo sulfonil halidos, como ejemplo, cloruro de triisopropilbencensulfonil.

Compuestos de péptidos-Fab de unión a la albúmina de la invención:

[0308] En un aspecto, el anticuerpo de la invención se fusiona con una proteína de unión a la albúmina. La unión a proteínas plasmáticas puede ser una manera eficaz de mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína que se encuentra en mayor abundancia en el plasma. Los péptidos de unión a la albúmina sérica (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de las proteínas fusionadas al dominio activo, incluyendo la alteración de la absorción, penetración y difusión de tejido. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse mediante la selección específica de la secuencia adecuada del péptido de unión a la albúmina sérica (EE.UU. 20040001827). Se identificaron una serie de péptidos de unión a la albúmina mediante la detección de representación en imágenes de fagos (Dennis y col., (2002) "Albumin Binding As A General Strategy for Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen secuencias de péptidos de unión a la albúmina (ABP) que se indican en: (i) Dennis y col., (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) EE.UU. 20040001827 en [0076] identificadores de secuencia n.°: 9-22; y (iii) en el documento WO 01/45746 en las páginas 12-13, los cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los Fabs de unión a la albúmina (ABP) están diseñados mediante la fución de un péptido de unión a la albúmina y el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con un coeficiente estequiométrico de 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Se demostró que la asociación de estos ABP-Fabs con la albúmina incrementó la semivida del anticuerpo más de 25 veces en conejos y ratones. Por lo tanto, los residuos Cys reactivos mencionados anteriormente pueden introducirse en estos ABP-Fabs y utilizarse para la conjugación específica de un punto con fármacos citotóxicos seguidos de estudios in vivo en animales.

[0309] Las secuencias de péptidos de unión a la albúmina ejemplares incluyen, entre otras, las secuencias de aminoácidos que se enumeran en los identificadores de secuencia n.°: 80-84:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.°: 80
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.°: 81
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	Identificador de secuencia n.°: 82
RLIEDICLPRWGCLWEDD	Identificador de secuencia n.°: 83
DICLPRWGCLW	Identificador de secuencia n.°: 84

Conjugados de anticuerpos con fármacos

[0310] En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco,

un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención también ofrece métodos de uso de los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b mencionados anteriormente unidos covalentemente a un agente citotóxico o detectable.

[0311] En un aspecto un anticuerpo CD79b de la invención se une al mismo epítopo en CD79b unido por otro anticuerpo CD79b. En otra forma de realización, un anticuerpo CD79b de la invención se une al mismo epítopo en CD79b unido al fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal generado de hibridomas depositados en ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006, un anticuerpo monoclonal que comprende dominios variables de identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B) o un anticuerpo quimérico que comprende los dominios variables de un anticuerpo generado a partir de los hibridomas PTA-7712 depositados en ATCC el 11 de julio de 2006 y dominios constantes de IgG1, o los dominios variables del anticuerpo monoclonal que comprende secuencias del identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B). En otra forma de realización, un anticuerpo CD79b de la invención se une al mismo epítopo en CD79b unido por otro anticuerpo CD79b (por ejemplo, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anticuerpo antihumano CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

[0312] En otro aspecto un anticuerpo CD79b de la invención se une a un epítopo en CD79b distinto al que está unido por otro anticuerpo CD79b. En otra forma de realización, un anticuerpo CD79b de la invención se une a un epítopo en CD79b distinto al epítopo unido por el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal generado de hibridomas depositados en ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006, un anticuerpo monoclonal que comprende dominios variables de identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B) o un anticuerpo quimérico que comprende el dominio variable de un anticuerpo generado a partir de los hibridomas depositados en ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006 y dominios constantes de IgG1, o los dominios variables del anticuerpo monoclonal que comprende secuencias del identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B). En otra forma de realización, un anticuerpo CD79b de la invención se une a un epítopo en CD79b distinto al epítopo en CD79b unido por otro anticuerpo CD79b (por ejemplo, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anticuerpo antihumano CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

[0313] En otro aspecto, un anticuerpo CD79b de la invención es distinto a (es decir, no es) un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal generado a partir de hibridomas depositados en ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006, el anticuerpo monoclonal comprende los dominios variables del identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B) o anticuerpo quimérico que comprende el dominio variable del anticuerpo generado a partir de hibridomas

depositados en ATCC como FTA-7712 el 11 de julio de 2006, y dominios constantes de IgG1, o los dominios variables de anticuerpo monoclonal que comprenden las secuencias del identificador de secuencia n.º.: 10 (Figura 7) e identificador de secuencia n.º: 14 (Figuras 8A-B). En otra forma de realización, un anticuerpo CD79b de la invención es distinto a (es decir, no es) un fragmento Fab de otro anticuerpo CD79b (por ejemplo, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), anticuerpo antihumano CD79b (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

[0314] En un aspecto, un anticuerpo de la invención se une específicamente al CD79b de una primera especie animal y no se une específicamente al CD79b de una segunda especie animal. En una forma de realización, la primera especie animal es un humano y/o un primate (por ejemplo, mono cynomolgus) y la segunda especie animal es murina (por ejemplo, un ratón) y/o canina. En una forma de realización, la primera especie animal es humana. En una forma de realización, la primera especie animal es primate, por ejemplo, mono cynomolgus. En una forma de realización, la segunda especie animal es murina, por ejemplo, ratón. En una forma de realización, la segunda especie animal es canina.

[0315] En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y una molécula vehículo. En una forma de realización, la molécula vehículo es farmacéuticamente aceptable.

[0316] En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucléicos que codifican un anticuerpo CD79b de la invención.

[0317] En un aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucléico de la invención.

[0318] En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucléico y un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo; por ejemplo, un vector recombinante, como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquiera de diversas células huésped. En una forma de realización, una célula huésped es una célula procariótica, por ejemplo, *E. coli*. En una forma de realización, una célula huésped es una célula eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO).

[0319] En un aspecto, la invención proporciona métodos de elaborar un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método para la elaboración de un anticuerpo CD79b (que, según se define en la presente memoria descriptiva, incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de estos), dicho método consiste en la expresión en una célula huésped idónea de un vector recombinante de la invención que codifique dicho anticuerpo (o un fragmento del mismo) y en la recuperación de dicho anticuerpo.

[0320] En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase; y una composición contenida dentro del envase, en el que la composición incluye uno o más anticuerpos CD79b de la invención. En una forma de realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una forma de realización, una composición que incluye un anticuerpo

20p

comprende, además, una molécula vehículo, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un artículo de fabricación de la invención comprende también instrucciones para la administración de la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

[0321] En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer envase que contiene una composición que incluye uno o más anticuerpos CD79b de la invención; y un segundo envase que contiene una solución tamponada. En una forma de realización, la solución tamponada es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una composición que incluye un anticuerpo antagonista comprende, además, una molécula vehículo, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un kit comprende también instrucciones para la administración de la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

[0322] En un aspecto, la invención permite usar un anticuerpo CD79b de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto..

[0323] En un aspecto, la invención permite usar un ácido nucléico de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto..

[0324] En un aspecto, la invención permite usar un vector de expresión de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0325] En un aspecto, la invención permite usar una célula huésped de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia

201

linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto..

[0326] En un aspecto, la invención permite usar un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0327] En un aspecto, la invención permite usar un kit de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad como cáncer, un tumor y/o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el cáncer, un tumor o un trastorno proliferativo se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto..

[0328] En un aspecto, la invención proporciona un método para la inhibición del crecimiento de una célula que expresa el CD79b el cual comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la invención que origina la inhibición del crecimiento de la célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0329] En un aspecto, la invención también ofrece métodos útiles para tratar terapéuticamente a un mamífero que tenga un tumor canceroso que comprenda un célula que exprese CD79b, dicho método comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención, y por tanto, tratar efectivamente a dicho mamífero. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0330] En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de un trastorno de la proliferación celular asociado a un aumento de la expresión o actividad de CD79b y dicho método comprende la administración a un sujeto que necesite dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención o de un anticuerpo de la invención conjugado con un fármaco, lo que permite tratar o prevenir eficazmente dicho trastorno de la proliferación celular. En una realización, dicho trastorno de la proliferación celular es cáncer. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0331] En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento celular, donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto de potenciación del

202

crecimiento del CD79b. Dicho método comprende el contacto de dicha célula con una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención y por lo tanto, inhibe el crecimiento celular. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0332] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar terapéuticamente un tumor den un mamífero, donde el crecimiento del tumor es al menos en parte dependiente de un efecto de potenciación del crecimiento del CD79b. Dicho método comprende el contacto de dicha célula con una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención y por lo tanto, tratar el tumor. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0333] En un aspecto, la invención provee un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un paciente de la formulación farmacéutica que consiste en un inmunoconjugado que se detalla en la presente memoria descriptiva, un diluyente aceptable, un vehículo o excipiente. En una forma de realización, el cáncer se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, al paciente se le administra un agente citotóxico en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo con fármaco.

[0334] En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir la proliferación de células B que consiste en exponer a la célula al inmunoconjugado compuesto de un anticuerpo de la invención bajo condiciones que permiten la unión del inmunoconjugado con el CD79b. En una forma de realización, el trastorno proliferativo de células B se selecciona entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, la célula B es un modelo de xenotrasplante. En una forma de realización, la exposición se produce in vitro. En una forma de realización, la exposición se lleva a cabo in vivo.

[0335] En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia de CD79b en una muestra que se sospecha que tiene CD79b, dicho método consiste en exponer la mencionada muestra a un anticuerpo de la invención y determinar la unión del anticuerpo con el CD79b en la muestra, donde la unión del antibiótico al CD79b, de dicha muestra es indicativa de la presencia de la proteína en la muestra. En una forma de realización, la muestra es una muestra biológica. En otra forma de realización, la muestra biológica contiene las células B. En una forma de realización, la muestra biológica se obtiene de un mamífero que tiene o se cree que tiene un trastorno de células B o un trastorno proliferativo de células B, o ambos, incluyendo, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica

203

crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0336] En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado con un aumento de células, tales como las células B, que expresan CD79b. Este método consiste en establecer un contacto entre células de prueba en una muestra biológica y cualquiera de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de unión del anticuerpo a células de prueba en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD79b y comparar el nivel de unión del anticuerpo a las células en una muestra de células de control, donde el nivel de unión del anticuerpo se normaliza a la cantidad de células que expresan CD79b en las muestras de células de prueba y de control, y en donde el nivel más elevado de unión del anticuerpo en la muestra de células de prueba comparado con la muestra de células de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a células que expresan CD79b.

[0337] En un aspecto, la invención proporciona un método de detección de CD79b soluble en la sangre o el suero. Este método comprende establecer el contacto entre una muestra de prueba de sangre o suero de un mamífero que se cree que experimenta un trastorno proliferativo de células B con un anticuerpo anti-CD79b de la invención, y detectar un aumento en el CD79b soluble en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En una forma de realización, el método de detección es útil como método de diagnóstico de trastornos proliferativos de células B asociados a un aumento de CD79b soluble en la sangre o en el suero de un mamífero.

[0338] En un aspecto, la invención proporciona un método de unión del anticuerpo de la invención con una célula que expresa CD79b. Dicho método consiste en establecer el contacto de la célula con un anticuerpo de la invención. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

[0339] Los métodos de la invención se pueden utilizar para influir en cualquier proceso patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados a la regulación ascendente de la expreción del CD79b En una forma de realización, una célula que se convierte en diana terapéutica en un método de la invención es una célula hematopoyética. Por ejemplo, se puede seleccionar una célula hematopoyética de un grupo formado por linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células asesinas naturales. En una forma de realización, una célula que se convierte en diana terapéutica en un método de la invención es una célula B o una célula T. En una forma de realización, una célula que se convierte en diana terapéutica en un método de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, puede seleccionarse una célula cancerosa del grupo compuesto por una célula de linfoma, una célula de leucemia o una célula de mieloma.

[0340] Los métodos de la invención pueden comprender también pasos adicionales de tratamiento. Por ejemplo, en una forma de realización, un método comprende, además, un paso en el que la célula y/o tejidos considerados diana terapéutica (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a radioterapia o a quimioterapia.

[0341] Tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, el CD79b es un componente de señal del receptor de la célula B. Por tanto, en una forma de realización de los métodos de la invención, una célula diana (por ejemplo, una célula cancerosa) que expresa CD79b se compara con una célula que no expresa CD79b. En otra forma de realización, la célula diana es una célula cancerosa en la que la expresión de CD79b se resalta en comparación con una célula normal no cancerosa del mismo tipo de tejido. En una forma de realización, un método de la invención causa la muerte de una célula considerada diana terapéutica.

[0342] En otros aspectos de la presente invención, ésta ofrece vectores que contienen ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva. También se proporciona la célula huésped que comprende cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células anfitrión pueden ser de CHO, E. coli o levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células huésped bajo las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y su recuperación del cultivo celular.

[0343] En otro aspecto, la invención concierne a la composición de sustancias que comprenden un anticuerpo anti-CD79b, según se describe en la presente memoria, en combinación con un vehículo. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0344] Otro aspecto de la presente invención se dirige al uso del anticuerpo polipeptídico anti-CD79b, según se detalla en la presente memoria descriptiva, para la preparación de un fármaco útil para el tratamiento de una afección que responde al anticuerpo polipeptídico anti-CD79b.

[0345] Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una mezcla compuestos de anticuerpos y fármacos de la Fórmula I, donde la carga promedio del fármaco por anticuerpo es de aproximadamente 2 a 5 o de aproximadamente 3 a 4.

[0346] Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que incluye un compuesto ADC de la Fórmula I , una mezcla de compuestos ADC de la Fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0347] Otro aspecto proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto ADC de la Fórmula I y un segundo compuesto que tiene propiedades antineoplásicas u otros efectos terapéuticos.

[0348] Otro aspecto es un método para causar la muerte o inhibir la proliferación de las células tumorales o cancerosas que comprenden el tratamiento de las células con una cantidad de conjugado de anticuerpo y fármaco de la Fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable, mostrando eficacia para causar la muerte o inhibir la proliferación de las células tumorales o cancerosas.

[0349] Otro aspecto es un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración a un paciente de una cantidad eficaz terapéuticamente de una composición farmacéutica que incluye ADC de Fórmula I.

[0350] Otro aspecto incluye artículos de fabricación, es decir, kits, que comprenden un

208

conjugado de anticuerpo y fármaco, un envase, un prospecto en el empaque o una etiqueta que indica el tratamiento.

[0351] Un aspecto de la invención es un método para la elaboración de un compuesto conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I que comprende los pasos de: (a) reacción de un grupo diseñado con cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo enlazador para formar un intermediario anticuerpo-enlazador Ab-L, y (b) reacción de Ab-L con una porción D de fármaco activado, mediante lo cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco, o comprendiendo los pasos de: (c) reacción de un grupo nucleófilo de una porción de fármaco con un reactivo enlazador para formar un intermediario fármaco-enlazador D-L, y (d) reacción de D-L con un grupo diseñado con cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína, mediante lo cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco.

[0352] Un aspecto de la invención es un ensayo para detectar las células cancerosas que comprende: (a) exponer las células a un conjugado de fármaco con anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína, y (b) determinar el grado de unión de dicho compuesto conjugado de fármaco con anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína a las células.

A. Anticuerpos anti-CD79b

[0353] En una forma de realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que pueden usarse en la presente memoria descriptiva como agentes terapéuticos. Entre los ejemplos de estos anticuerpos se incluirían los policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[0354] Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilicen péptidos sintéticos) con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se deba inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar con hemocianina de lapa (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o un inhibidor de tripsina de semilla de soja, empleando un agente bifuncional o derivador, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$, o $R^1N=C=NR$, donde R y R^1 son grupos alquilo distintos.

[0355] Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg ó 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo comprendida entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Entre 7 y 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta obtener los niveles adecuados de valoración. Los conjugados también se pueden obtener en cultivos

206

celulares recombinantes como fusiones proteínicas. Asimismo, los agentes agregantes como el alumbre se utilizan adecuadamente para incrementar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

[0356] Se pueden conseguir anticuerpos monoclonales por el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o el del ADN recombinante (patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0357] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y, luego, se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0358] Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas (también denominado socio de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

[0359] Las células de mieloma preferentes como socios de fusión son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles de producción estable de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, como aquellas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, en San Diego, California, EE.UU. y las células SP-2 y derivados, por ejemplo, las X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection, en Manassas, Virginia, EE. UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0360] El medio de cultivo en que crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o un ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

207

[0361] La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal se puede, por ejemplo, determinar mediante el análisis Scatchard descrito en Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[0362] Después de identificar a las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medios D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis tumoral en un animal; por ejemplo, inyectando las células en ratones por vía intraperitoneal.

[0363] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos, como por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, empleando proteína A o G-sefarosa), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0364] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan a células huésped como por ejemplo células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen el anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Rev. 130:151-188 (1992).

[0365] En otra realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. En publicaciones posteriores, se describe la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante combinación de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy amplias (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de los mismos.

[0366] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, sustituyendo las secuencias de los dominios constantes de la cadena pesada y cadena ligera humanas (C_H and C_L) por las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison, y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o

fusionando la secuencia codificadora de la inmunoglobulina con todo o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Estas secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación del antígeno con especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tenga especificidad para un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0367] Los anticuerpos anti-CD79b de la invención pueden comprender también anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región de determinación de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata o el conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni la CDR importada o las secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en los que todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR correspondan a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR sean las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. De forma óptima, los anticuerpos humanizados también comprenderán por lo menos una porción de una inmunoglobulina de región constante (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

[0368] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos "importados", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente a través del método de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239:1534-1536 (1988)], al sustituir las secuencias CDRs o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. No. 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que los residuos de

209

CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, se sustituyen por residuos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

[0369] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán para realizar los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano antiratón), cuando se prevé dar un uso terapéutico humano al anticuerpo. La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Véase, por ejemplo, Khaxzaeli y col., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers y col., Transplantation (1986), 41:572; Shawler y col., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears y col., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller y col., Blood (1983), 62:988; Hakimi y col., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann y col., Nature (1988), 332:323; y Junghans y col., Cancer Res. (1990), 50:1495. Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, la invención proporciona anticuerpos que son humanizados, de forma que la respuesta HAMA se reduce o elimina. También se pueden obtener variantes de estos anticuerpos utilizando métodos habituales conocidos en la materia, algunos de los cuales se describen más adelante. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la biblioteca de secuencias de dominio variable de humanos conocidas. La secuencia del dominio V humano que se encuentra más cercano al del roedor se identifica y la región de estructura humana (FR) dentro de éste se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método utiliza una región estructural concreta derivada de la secuencia consensual de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede utilizar la misma estructura para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

[0370] Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se describe en la presente memoria descriptiva puede servir como secuencia de inicio (parental) para la diversificación de la(s) secuencia(s) de estructura y/o hipervariables. Una secuencia de la estructura seleccionada a la que la secuencia hipervariable de inicio está enlazada se denomina estructura humana del aceptor en la presente memoria descriptiva. Aunque las estructuras humanas de aceptor pueden proceder o derivarse de una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de la misma), preferentemente proceden o se derivan de una secuencia de la estructura de consenso humana, dado que estas estructuras han demostrado tener una inmunogenicidad mínima o carecer de ella en pacientes humanos.

[0371] Cuando el aceptor se deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia de estructura humana que se selecciona en función de su homología con la secuencia de estructura del donante, alineando la secuencia de estructura del donante con varias secuencias de estructura humanas en una colección de secuencias de estructura humanas, y seleccionando como aceptor la secuencia de estructura más homóloga.

210

[0372] En una forma de realización, las estructuras de consenso humanas de la presente memoria descriptiva proceden o se derivan de secuencias de estructuras de consenso de VH del subgrupo III y/o kappa de VL del subgrupo I.

[0373] De este modo, la estructura humana de VH del aceptor puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de estructura siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (identificador de secuencia no.: 69),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (identificador de secuencia no.: 70),

FR3 que comprende FR3 que comprende RFTISX$_1$DX$_2$SKNTX$_3$YLQMNSLRAEDTAVYYC (identificador de secuencia no.: 73), donde X$_1$ es A o R, X$_2$ es T o N, y X$_3$ es A o L,

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (identificador de secuencia no.: 72).

[0374] Ejemplos de las estructuras de consenso de VH incluyen:

estructura de consenso del subgrupo I humano VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia no.: 36);

estructura de consenso del subgrupo I humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia números: 37-39);

estructura de consenso del subgrupo II humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia números: 40);

estructura de consenso del subgrupo II humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia números: 41-43);

estructura de consenso del subgrupo III humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia números: 44);

estructura de consenso del subgrupo III humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia números: 45-47);

estructura del aceptor humano VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia número: 48);

estructura del aceptor humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia números: 49-50);

estructura del aceptor 2 humano VH menos las CDR de Kabat (identificador de secuencia no.: 51); o

estructura del aceptor 2 humano VH menos regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia números: 52-54).

[0375] En una forma de realización, la estructura humana de VH del aceptor puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de estructura siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (identificador de secuencia no.: 69),

FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (identificador de secuencia no.: 70),

FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (identificador de secuencia no.: 71),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAI (identificador de secuencia no.: 74),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (identificador de secuencia no.: 75),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (identificador de secuencia no.: 76); o

211

FFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (identificador de secuencia no.: 77)

FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (identificador de secuencia no.: 72).

[0376] La estructura humana de VL del aceptor puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de estructura siguientes:

FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (identificador de secuencia no.: 65),

FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLIY (identificador de secuencia no.: 66),

FR3 que comprende GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (identificador de secuencia no.: 67),

FR4 que comprende FGQGTKVEIKR (identificador de secuencia no.: 68).

[0377] Ejemplos de las estructuras de consenso de VL incluyen:

estructura de consenso del subgrupo I humano kappa VL (identificador de secuencia no.: 55);

estructura de consenso del subgrupo II humano kappa VL (identificador de secuencia no.: 56);

estructura de consenso del subgrupo III humano kappa VL (identificador de secuencia no.: 57); o

estructura de consenso del subgrupo IV humano kappa VL (identificadores de secuencia números: 58)

[0378] Aunque el aceptor puede tener una secuencia idéntica a la secuencia de la estructura humana seleccionada, ya sea que proceda de una inmunoglobulina humana o de una estructura de consenso humana, la presente invención contempla que la secuencia del aceptor pueda comprender sustituciones de aminoácidos preexistentes con respecto a la secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia de la estructura de consenso humana. Estas sustituciones preexistentes son preferentemente mínimas; por lo general, sólo cuatro, tres, dos o una diferencias aminoacídicas con respecto a la secuencia de la inmunoglobulina humana o a la secuencia de la estructura de consenso.

[0379] Los residuos de la región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan en las estructuras humanas de VL y/o VH del aceptor. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos que corresponden a los residuos de la CDR según Kabat, los residuos de un asa hipervariable de Chothia, los residuos de un Abm y/o los residuos de contacto. Opcionalmente, se incorporan los residuos extendidos de la región hipervariable que siguen a continuación: 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65, 47-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3).

[0380] Aunque la "incorporación" de residuos de la región hipervariable se trata en la presente memoria descriptiva, cabe señalar que se puede lograr de diversos modos, por ejemplo, se puede generar ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos deseada mediante mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio variable de ratón, de forma que los residuos de la estructura del mismo pasan a ser residuos de la estructura humana del aceptor, o mediante mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio variable humano, de forma que los residuos del dominio hipervariable pasan a ser residuos no humanos, o mediante síntesis del ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

[0381] En los ejemplos de la presente memoria descriptiva, las variantes injertadas en la región hipervariable se generaron mediante mutagénesis de Kunkel del ácido nucleico que codifica las secuencias del aceptor humano, utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel *y col.*,

Methods Enzymol. 154:367-382 (1987). Se pueden introducir cambios apropiados dentro de la región de estructura y/o hipervariable, utilizando técnicas habituales, para corregir y reestablecer interacciones región hipervariable-antígeno correctas.

[0382] La presentación en fagos (fagómidos) (a la cual también se hace referencia en algunos contextos de la presente memoria descriptiva simplemente como presentación en fagos) se puede utilizar como un método cómodo y rápido para generar y examinar muchas posibles variantes diferentes de anticuerpos en una biblioteca generada mediante aleatorización de secuencias. No obstante, las personas cualificadas tienen a su disposición otros métodos para elaborar y examinar los anticuerpos modificados.

[0383] La tecnología de representación en fagos ha proporcionado una potente herramienta para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen a un ligando, como un antígeno. La utilización de las técnicas de presentación en fagos (fagómidos) permite generar grandes bibliotecas de variantes de proteínas que se pueden clasificar con rapidez para hallar aquellas secuencias que se unen a una molécula objetivo con afinidad elevada. Los ácidos nucleicos que codifican variantes de polipéptidos se fusionan, por lo general, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la cápside de un virus, como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas monovalentes de presentación en fagómidos en los que la secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácidos nucleicos que codifican una porción de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins,* 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology,* 3:205 (1991)). En un sistema monovalente de presentación en fagómidos, la fusión de genes se expresa en niveles bajos y también se expresan las proteínas del gen III de tipo natural, de forma que se conserva la infectividad de las partículas. Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y de selección de esas bibliotecas se han descrito en muchas patentes (por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5.723.286, patente de EE.UU. No. 5.432.018, patente de EE.UU. No. 5.580.717; patente de EE.UU. No. 5.427.908 y patente de EE.UU. No. 5.498.530).

[0384] Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o de polipéptidos de unión a antígeno de diversas formas, incluida la alteración de un único gen mediante la inserción aleatoria de secuencias de ADN o mediante la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos de presentación de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno mediante la tecnología de representación en fagos se han descrito en las patentes de EE.UU. números 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717 y 5.658.727. Luego, se procede a tamizar la biblioteca para detectar la expresión de anticuerpos o de proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.

[0385] Los métodos de sustitución de un aminoácido de elección en un ácido nucleico de plantilla son bien conocidos en la materia y algunos de ellos se describen en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los residuos de la región hipervariable se pueden sustituir utilizando el método de Kunkel. Véase, *p. ej.,* Kunkel *y col., Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

[0386] La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para los residuos de la región hipervariable a modificar. Un conjunto de codones es un grupo de

213

distintas secuencias de tripletes de nucleótidos usado para codificar las variantes de aminoácidos deseadas. Los conjuntos de codones se pueden representar mediante símbolos para designar a nucleótidos concretos o a mezclas equimolares de nucleótidos, como se muestra a continuación según el código IUB.

CÓDIGOS IUB

[0387] G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

H (A o C o T)

B (C o G o T)

V (A o C o G)

D (A o G o T) H

N (A o C o G o T)

[0388] Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede estar formado por los nucleótidos A o G o T; V puede estar formado por A o G o C; y K puede estar formado por G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones distintos y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

[0389] Se pueden sintetizar conjuntos de cebadores u oligonucleótidos utilizando métodos estándar. Es posible sintetizar un conjunto de oligonucleótidos mediante síntesis durante la fase sólida, por ejemplo, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificará el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de los nucleótidos seleccionados en determinadas posiciones es bien conocida en la materia. Estos conjuntos de nucleótidos con determinados conjuntos de codones pueden sintetizarse mediante sintentizadores de ácidos nucleicos comercializados (disponibles, por ejemplo, a través de Applied Biosystems, Foster City, CA) o se pueden adquirir (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tenga un conjunto concreto de codones incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, y estas diferencias estarán establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia total. Los oligonucleótidos, según se utilizan en la presente invención, tienen secuencias que permiten la hibridación de una plantilla de ácidos nucleicos de dominio variable y también pueden incluir sitios con enzimas de restricción para fines de clonación.

[0390] En un método, se pueden crear secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de aminoácidos mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en la materia y fue descrita por Zoller y col, 1987, *y col. Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Explicado brevemente, se crean secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de ácidos nucleicos mediante hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los conjuntos de codones deseados con una plantilla de ADN, donde dicha plantilla es la forma de hebra única del plásmido que contiene una secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable. Tras la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa de la plantilla, que, de este modo, incorporará el cebador oligonucleótido y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto oligonucleótido.

[0391] Por lo general, se utilizan oligonucleótidos de por lo menos 25 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo tendrá entre 12 y 15 nucleótidos que son completamente complementarios con respecto a la plantilla en cada lado de la codificación del nucleótido o nucleótidos para la mutación o mutaciones. Esto garantiza que la hibridación del oligonucleótido con la molécula de la plantilla de ADN de hebra única se llevará a cabo correctamente. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en la materia, como la descrita por Crea y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

[0392] La plantilla de ADN está generada ya sea por aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles comercialmente son apropiados) o por aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fagos de hebra única, como se describe en Viera *y col.*, *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). De este modo, el ADN que se va a mutar se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de hebra única. La producción de la plantilla de hebra única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook *y col.*, citado anteriormente.

[0393] Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibrida con la plantilla de hebra única en condiciones de hibridación apropiadas. A continuación, se añade una enzima polimerizadora del ADN, por lo general la ADN polimerasa T7 o el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para sintetizar la hebra complementaria de la plantilla utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Por lo tanto, una molécula heterodúplex se forma de tal manera que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y otra hebra (la plantilla original) codifica la secuencia no alterada nativa del gen 1. Esta molécula heterodúplex se transforma en una célula huésped apta, por lo general, una procariota tal como *E. coli* JM101. Tras cultivar las células, se colocan en placas de agarosa y se analizan utilizando el cebador oligonucleótido radiomarcado con 32-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

[0394] El método recién descrito se puede modificar, de forma que se forme una molécula homodúplex en la que las dos hebras del plásmido contengan la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de hebra única se templa con la plantilla de hebra única como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos,

215

desoxirribоadenosina (dATP), desoxirribоguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTT), con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo formado por el oligonucleótido y la plantilla. Al añadir a la mezcla la ADN polimerasa, se genera una hebra de ADN idéntica a la plantilla, salvo por las bases mutadas. Además, esta nueva hebra de ADN contendrá dCTP-(aS) en vez de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión por endonucleasa de restricción. Una vez que se hace una muesca en la cadena de la plantilla del heterodúplex de doble cadena utilizando una enzima de restricción apropiada, la cadena de la plantilla se puede digerir con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio o los sitios que se van a mutagenizar. A continuación, se detiene la reacción para dejar una molécula que es sólo parcialmente de hebra única. Entonces, se forma un homodúplex de ADN de hebra doble completo utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos desoxirribonucleótidos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex se puede transformar entonces en una célula huésped apropiada.

[0395] Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos tiene longitud suficiente para hibridarse con el ácido nucleico de la plantilla y también puede contener sitios de restricción, pero no necesariamente. La plantilla de ADN se puede generar mediante aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 o mediante aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fagos de hebra única, como se describe en Viera *y col., Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). De este modo, el ADN que se va a mutar se debe insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de hebra única. La producción de la plantilla de hebra única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook *y col., citado anteriormente*.

[0396] De acuerdo con otro método, la unión de antígenos se puede restaurar durante la humanización de los anticuerpos a través de la selección de regiones hipervariables reparadas (Véase la solicitud No. 11/061,841, registrada el 18 de febrero de 2005). El método incluye la incorporación de regiones hipervariables no humanas en una estructura del aceptor y, además, la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables sin modificar la secuencia de estructura del aceptor. Alternativamente, la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos puede estar acompañada de modificaciones en la secuencia de estructura del aceptor.

[0397] Según otro método, se puede generar una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo del promotor y después del extremo del gen, de forma que cada conjunto tenga una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes y las distintas secuencias establecidas por los conjuntos de codones estén dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' del promotor y después del extremo 3' del gen, junto con una secuencia de ácidos nucleicos de la plantilla del dominio variable, se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos obtenidos mediante PCR. Se puede hacer referencia a los productos obtenidos mediante PCR como "casetes de ácidos nucleicos", puesto que se pueden fusionar con otras secuencias de ácidos nucleicos afines o no afines, por ejemplo,

proteínas de la cápside de un virus y dominios de dimerización, utilizando técnicas reconocidas en biología molecular.

[0398] La secuencia de los cebadores de la PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles a un solvente y de alta diversidad en una región hipervariable. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codones es un grupo de distintas secuencias de tripletes de nucleótidos usado para codificar variantes de aminoácidos deseadas.

[0399] Los selectantes de anticuerpos que satisfacen los criterios deseados, seleccionados mediante los pasos de selección/tamizaje apropiado, se pueden aislar y clonar utilizando técnicas recombinantes estándar.

[0400] También es importante que los anticuerpos sean humanizados reteniendo una afinidad de unión alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo el procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y de las humanizadas. Generalmente, se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que los residuos probablemente desempeñan en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el antígeno o antígenos objetivo. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión del antígeno.

[0401] Se contemplan diversas formas de anticuerpos anti-CD79b humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0402] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen del anticuerpo que se une a la región de la cadena pesada (J_H) en ratones quiméricos y en líneas germinales de ratones mutantes resulta en una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes con líneas germinales resultará en la producción de anticuerpos humanos ante la presencia del antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno. 7:33 (1993); patentes

217

de EE.UU. Nos. 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

[0403] Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., Nature 348:552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, del repertorio de genes de dominios de inmunoglobulina variables (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de los dominios V de los anticuerpos se clonan dentro de la estructura en un gen proteínico con revestimiento o bien mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola hebra del genoma del fago, las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita alguna de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, revisados, por ejemplo, en Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Es posible utilizar diversas fuentes de segmentos del gen V para la presentación de fagos. Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron un conjunto de anticuerpos anti-oxazolona diversos de una pequeña biblioteca combinatoria de genes V aleatoria derivada de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un conjunto de antígenos diversos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). Consúltense también las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0404] Como se describe anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (consúltense las patentes de los EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

4. Anticuerpos monoclonales

En determinadas circunstancias, resulta ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos enteros. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede brindar mejor acceso a los tumores sólidos.

[0405] Se han desarrollado varias técnicas para producir fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y ser químicamente unidos para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro planteamiento, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y $F(ab')_2$ con vida media in

218

vivo aumentada que comprende residuos de un epítopo de unión a receptor de rescate se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el facultativo cualificado. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. No. 5.571.894 y la patente de EE.UU. No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están privadas de regiones constantes; por ello, son aptas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fución sFv se pueden construir para obtener la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los extremos amino o carboxi terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", tal y como se describe en la patente de EE.UU. No. 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0406] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína CD79b, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Otros anticuerpos de este tipo pueden combinar un punto de unión de CD79b con un punto de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo del anti-CD79b puede estar combinado con un brazo que se une a una molécula detonante en un leucocito, como una molécula receptora célula T (por ejemplo, CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular para la célula de expresión CD79b. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan el CD79b. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD79b y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporin, anti-interferón- α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o haptano con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

[0407] El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la patente de Estados Unidos No. 5.837.234 revela un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. Un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα se muestra en el documento WO98/02463. La patente de los Estados Unidos No. 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0408] Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y col., Nature 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de

219

afinidad, es bastante engorrosa y la cantidad de producto que se obtiene es baja. Se revelan métodos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

[0409] Según un enfoque distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de domino constante de la inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con una cadena pesada de Ig de dominio constante, que comprende por lo menos parte de la bisagra de las regiones C_H2, y C_H3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera esté presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se transfectan conjuntamente a una célula huésped adecuada. Esto permite una mayor flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en formas de realización donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o para las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión, cuando la expresión es de al menos dos cadenas de polipéptidos en resultados con proporciones iguales en rendimientos altos o cuando las proporciones no influyen significativamente en el rendimiento de la cadena deseada.

[0410] En una forma de realización preferente de este planteamiento, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona un método de fácil separación. Este planteamiento se dio a conocer en el documento WO 94/04690. Para obtener más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, consúltese, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

[0411] Según otro planteamiento descrito en la patente de los Estados Unidos No. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz que se prefiere comprende al menos parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) laterales largas se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo, al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con relación a otros productos finales no deseados como los homodímeros

220

[0412] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para que células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE.UU. No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y la patente europea No. 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener utilizando cualquier método de enlace cruzado adecuado. Los agentes reticulantes adecuados son bien conocidos en la materia, y se dan a conocer en la patente de los EE.UU. No. 4.676.980 junto con un gran número de técnicas reticulantes.

[0413] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando enlaces químicos. Brennan y col., Science 229:81 (1985) describen un procedimiento mediante el cual los anticuerpos intactos se escinden por vía proteolítica para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con el ditiol, el arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de bisulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB posteriormente se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0414] Avances recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica $F(ab')_2$ completamente humanizada. Cada uno de los fragmentos Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra blancos de tumor de mama humano.

[0415] Se han descrito también diversas técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se oxidaron de nuevo para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el acoplamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y

V_L de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos lugares de unión del antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Consúltese Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

[0416] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0417] Los anticuerpos heteroconjugados también están en el alcance de la presente invención. Éstos se componen de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para que las células del sistema inmunitario actúen sobre las células no deseadas [patente de EE.UU. No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección de VIH [WO 91/00360, WO 92/200373 y la patente europea No. 03089]. Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *in vitro* mediante métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos en que intervienen agentes reticulantes. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir empleando una reacción de intercambio de bisulfuros o formando un puente de tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se encuentran iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los que se señalan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

[0418] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más puntos de unión al antígeno. El dominio preferente de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminal a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente en la presente memoria descriptiva comprende (o consiste en) entre tres y ocho, aunque preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente dos), comprendiendo ésta(s) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos pueden comprender VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, donde VD1 es un primer dominio de variable, VD2 es un segundo dominio de variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan una aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos pueden comprender: una cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc o una cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva preferentemente comprende también al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, puede comprender entre dos y

ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

8. Ingeniería de la función efectora

[0419] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención en lo referente a la función efectora, por ejemplo, para incrementar la citotoxicidad con mediación celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. De manera alternativa o adicional, uno o más residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, lo que permite la formación en esta región de un puente bisulfuro entre las cadenas. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener mayor capacidad de internalización o eliminación celular con mediación de complementos y citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Consúltese Caron y col., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede diseñar un anticuerpo con dobles regiones Fc y, por tanto, potenciar la lisis de los complementos y las capacidades de la ADCC. Consúltese Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para incrementar la vida media sérica del anticuerpo, se puede incorporar al anticuerpo (especialmente en un fragmento del mismo) un epítopo de unión a un receptor de rescate, tal como se describe en la patente de EE.UU. No. 5.739.277, por ejemplo. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítopo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que es responsable de incrementar la vida media sérica *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunoconjugados

[0420] La invención también se refiere a inmunoconjugados (denominados de igual forma como "conjugados de anticuerpos con fármacos" o "ADC"), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, como por ejemplo un agente quimioterapéutico, una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, micótico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado).

[0421] En ciertas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos que son útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no unidos de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y

223

los tricotecenos. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos están ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se realizan utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina)), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *y col.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0422] Se contemplan también en esta memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, como caliqueamicina, péptidos de auristatina, como monometilauristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maitansinoides, como DM1, un tricoteceno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que poseen actividad tóxica.

Inmunoconjugados ejemplares: Conjugados de anticuerpos con fármacos

[0423] Un inmunoconjugado (o "conjugado de anticuerpo con fármacos" ("ADC")) de la invención puede ser la Fórmula I, que figura a continuación, donde un anticuerpo se conjuga (es decir, se une covalentemente) con una o más fracciones de fármaco (D) a través de un enlazador opcional (L). Los ADC pueden incluir conjugados de fármacos thioMAb ("TDC").

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

[0424] De acuerdo con esto, el anticuerpo puede estar conjugado al fármaco de forma directa o por vía de un enlazador. En la Fórmula I, p es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo, que puede oscilar, por ejemplo, entre alrededor de 1 y 20 fracciones de fármaco por anticuerpo y, en ciertas formas de realización, entre 1 y alrededor de 8 fracciones de fármaco por anticuerpo. La invención incluye una composición que comprende una mezcla de compuestos de fármaco-anticuerpo de Fórmula I en donde el promedio de carga por anticuerpo es de alrededor de 2 a 5, o de alrededor de 3 a 4.

a. Enlazadores ejemplares

[0425] Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo (un "PAB") y aquellos que resulten de la conjugación con agentes enlazadores: Pentanoato de n-succinimidil 4-(2-piridiltio) ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC", también

denominado en esta memoria descriptiva como "MCC") y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen diversos componentes enlazadores en la materia, algunos de los cuales se describen más adelante.

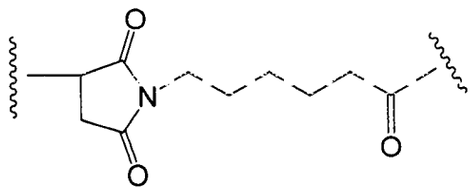
[0426] Un enlazador puede ser un "enlazador escindible", que facilite la liberación de un fármaco en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a la proteasa (por ejemplo, sensible a la peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga bisulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. No. 5.208.020).

[0427] En ciertas formas de realización, un enlazador es como se muestra en la siguiente Fórmula II:

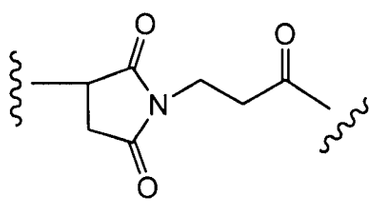
$$—A_a—W_w—Y_y— \qquad \text{II}$$

donde A es una unidad de extensión y a es un número entero comprendido entre 0 y 1, W es una unidad de aminoácidos y w es un número entero comprendido entre 0 y 12; Y es una unidad espaciadora e y es 0, 1 ó 2; y Ab, D y p se definen como se ha descrito anteriormente para la Fórmula I. En la solicitud de patente de EE.UU. No. 2005-0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia, se describen las formas de realización ejemplares de estos enlazadores.

[0428] En algunas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una "unidad de extensión" que une un anticuerpo con otro componente enlazador o con una fracción de un fármaco. A continuación se muestran unidades de extensión ejemplares (en las que la línea ondulada indica sitios de enlace covalente a un anticuerpo):

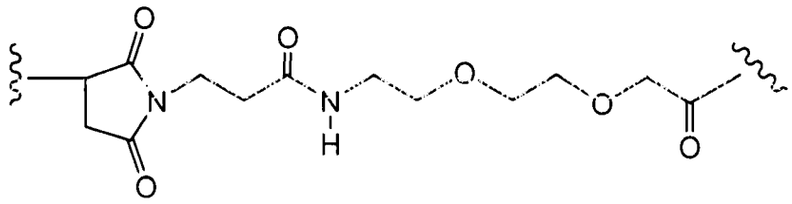


MC

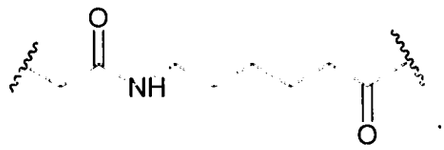


MP

225



MPEG



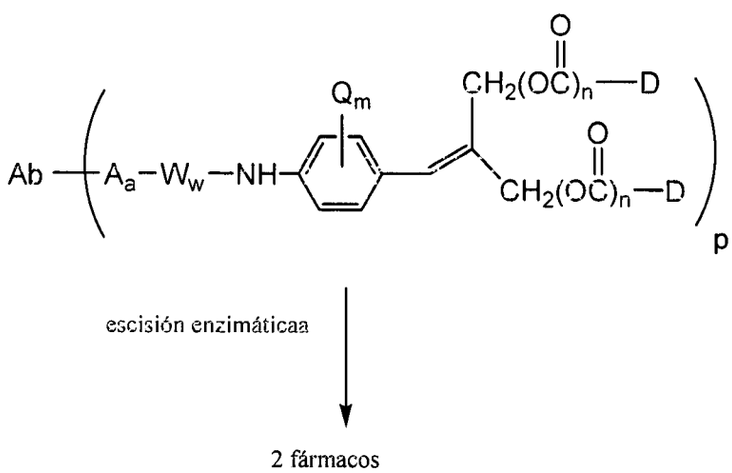
[0429] En ciertas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una unidad de aminoácidos. En una de estas formas de realización, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, lo que facilita la liberación del fármaco desde el inmunoconjugado tras exposición a proteasas intracelulares, como enzimas lisosomales. *Véase, p. ej.*, Doronina y col. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784. Entre las unidades de aminoácidos ejemplares se encuentran, pero no están limitados a, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido y un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); o N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender residuos de aminoácidos que ocurren de forma natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no ocurren de forma natural, como la citrulina. Las unidades de aminoácidos se pueden designar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

[0430] En algunas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una unidad "espaciadora" que une el anticuerpo a una fracción de fármaco, bien directamente, bien mediante una unidad de extensión o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser "autoinmoladora" o "no autoinmoladora". Una unidad espaciadora "no autoinmoladora" es aquella en la que la totalidad o parte de la unidad espaciadora permanece unida a la fracción del fármaco tras escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Entre los ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmoladoras están, pero no están limitadas a, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. Se consideran además otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de escisión enzimática específica para una secuencia. Por ejemplo, la escisión enzimática de un ADC que contenga una unidad espaciadora de glicina-glicina mediante una proteasa asociada a una célula tumoral daría lugar a la liberación de una fracción del fármaco de glicina-glicina desde el resto del ADC. En una de estas formas de realización, la fracción del fármaco de glicina-glicina se somete, entonces, a una fase independiente de hidrólisis en la célula tumoral, lo que permite la escisión de la unidad espaciadora de glicina-glicina de la fracción del fármaco.

226

[0431] Una unidad espaciadora "autoinmoladora" permite la liberación de la fracción del fármaco sin una fase de hidrólisis independiente. En determinadas formas de realización, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad p-aminobencilo. En una de estas formas de realización, un alcohol p-aminobencilo se une a una unidad de aminoácidos mediante un enlace amida, y se introduce un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y un agente citotóxico. *Véase, p. ej.*, Hamann y col., (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103. En una forma de realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). En algunas formas de realización la porción fenileno de la unidad p-amino bencilo se sustituye con Qm, donde Q es -C_1-C_8 alquilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -halógeno,- nitro o -ciano; y m es un número entero entre 0 y 4. Ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmoladoras incluyen además, pero no están limitadas a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al alcohol p-aminobencilo (*véase, por ejemplo*, EE.UU. 2005/0256030 A1), como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que sean sometidos a ciclización tras hidrólisis del enlace amida, como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues y col., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); sistemas en anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos adecuadamente (Storm y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos que contengan aminas que son sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury y col., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autoinmoladores útiles en los ADC.

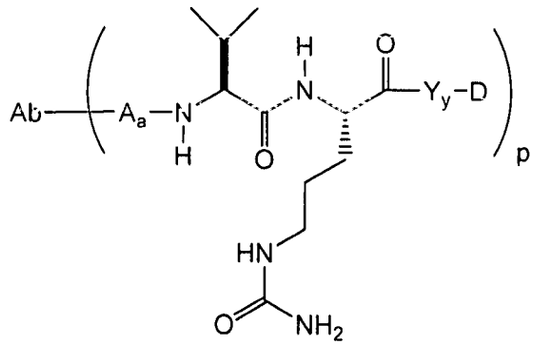
[0432] En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad ramificada bis(hidroximetil)estireno (BHMS) como se muestra a continuación, la cual se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos.



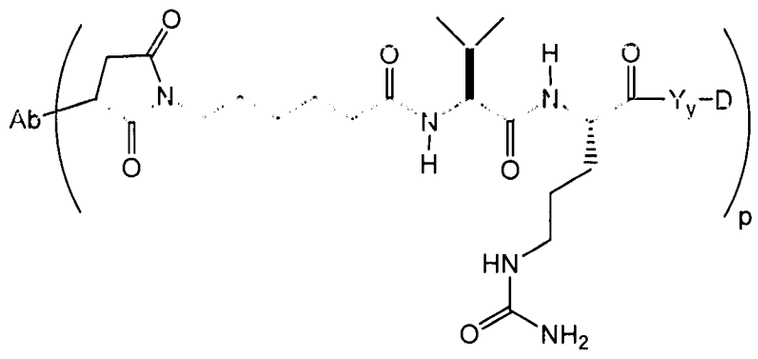
donde Q es -C_1-C_8 alquil, -O-(C_1-C_8 alquil), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero entre 0 y 4; n es 0 ó 1; y p con un rango entre 1 a alrededor de 20.

[0433] En otra forma de realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo a través de una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun y col., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo diseñado de cisteína sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir muchísimas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico.

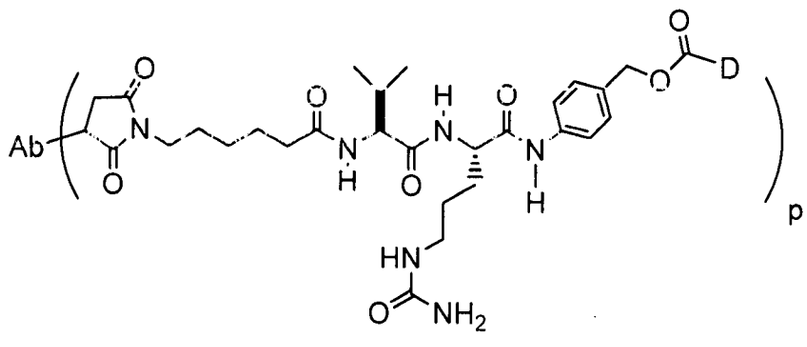
[0434] Los componentes enlazadores ejemplares y las combinaciones de los mismos se muestran a continuación en el contexto de los ADC de la Fórmula II:



Val-Cit o VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

228

[0435] Los componentes enlazadores, incluidas las unidades de extensión, espaciadora y de aminoácidos, se pueden sintetizar mediante métodos conocidos en la materia, como los descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2005-0238649 A1.

b. Fracciones de fármacos ejemplares

(1) Maitansina y maitansinoides

[0436] En algunas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitancina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. No. 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitancinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE.UU. No. 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. No. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

[0437] Las fracciones de fármacos maitansinoides son fracciones de fármacos que resultan atractivas para la elaboración de conjugados de anticuerpos con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores de bisulfuro y no bisulfuro con anticuerpos, (iii) poseen estabilidad en plasma, y (iv) resultan eficaces frente a distintas líneas celulares tumorales.

[0438] Los compuestos de maitansina aptos para uso como fracciones de fármacos maitansinoides son bien conocidos en el sector y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética (EE.UU. 6790952; EE.UU. 2005/0170475; Yu y col. (2002) PNAS 99:7968-7973). El maitansinol y los análogos del maitansinol también se pueden preparar de forma sintética mediante métodos conocidos.

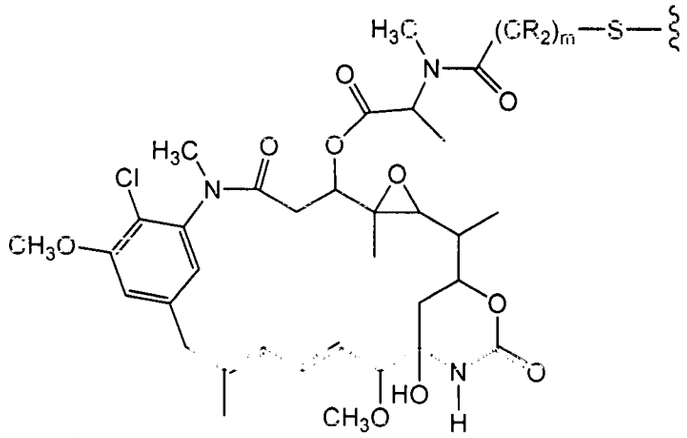
[0439] Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides están los que tienen un anillo aromático modificado, como por ejemplo: C-19-decloro (patente de EE.UU. No. 4256746) (preparado por reducción de ansamitocina P2 mediante hidruro de litio-aluminio); C-20-hidroxi (o C-20-demetil) +/-C-19-decloro (patentes de EE.UU. Nos. 4361650 y 4307016) (preparado mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o declorinación con LAH); y C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-decloro (patente de EE.UU. No. 4.294.757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

[0440] Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides también están los que tienen modificaciones como por ejemplo: C-9-SH (patente de EE.UU. No. 4424219) (preparado por la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5); C-14-alcoximetil(demetoxi/CH_2OR)(EE.UU. 4331598); C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH_2OH o CH_2OAc) (patente de EE.UU. No. 4450254) (preparado de Nocardia); C-15-

hidroxi/aciloxi (EE.UU. 4364866) (preparado por la conversión del maitancinol por Streptomyces); C-15-metoxi (patentes de EE.UU. Nos. 4313946 y 4315929) (aislado de Trewia nudiflora); C-18-N-demetil (patentes de EE.UU. Nos. 4362663 y 4322348) (preparado por la desmetilación de maitancinol por Streptomyces); y 4,5-deoxi (EE.UU. 4371533) (preparado por la reducción de maitancinol por el tricloruro de titanio/LAH).

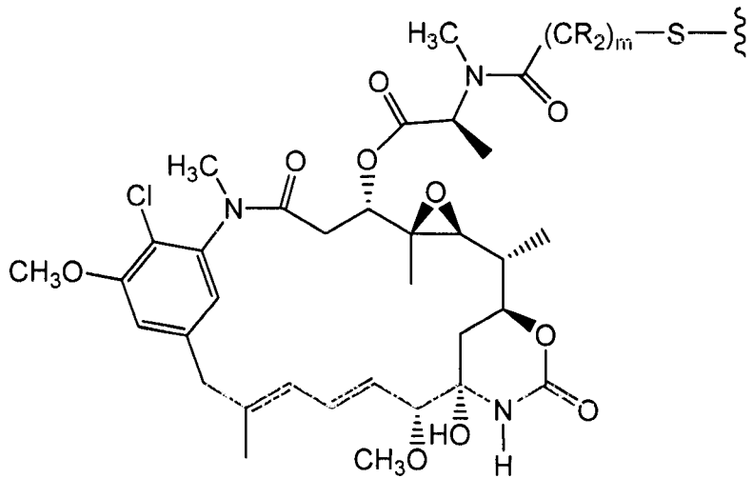
[0441] Se sabe que muchas posiciones de los compuestos de maitancina son útiles en la posición de enlace, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, para formar un enlace de éster, son adecuadas la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo (EE.UU. 5208020; EE.UU. RE39151; EE.UU. 6913748; EE.UU. 7368565; EE.UU. 2006/0167245; EE.UU. 2007/0037972).

[0442] Las fracciones de fármacos de maitancinoides incluyen aquellos que tienen la estructura:

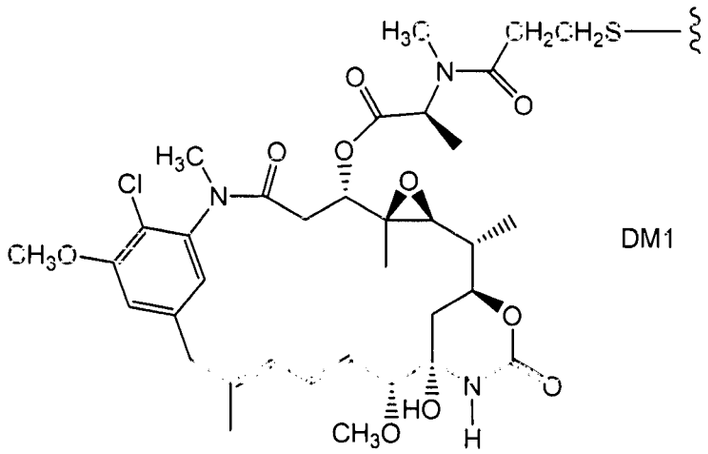


donde la línea ondulante indica el enlace covalente en el átomo de azufre de la fracción de fármaco de maitancinoide a un enlazador de ADC. Independientemente, R puede ser H o un alquil C_1–C_6. La cadena alquileno que une el grupo amida con el átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo, o propilo, es decir, m es 1, 2, ó 3 (EE.UU. 633410; EE.UU. 5208020; EE.UU. 7276497; Chari y col. (1992) *Cancer Res.* 52:127-131; Liu y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623).

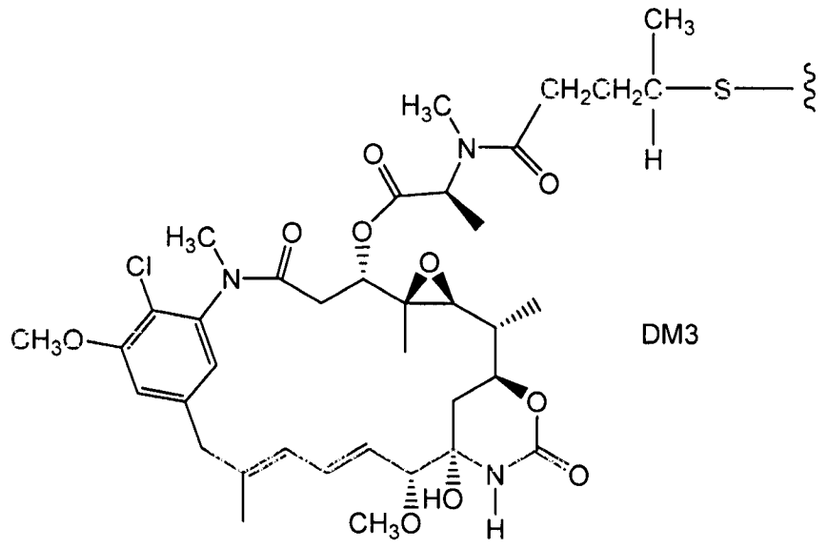
[0443] Todos los estereoisómeros de la fracción de fármaco del maitancinoide se contemplan para los compuestos de la invención, es decir, cualquier combinación de configuraciones de *R* y *S* en los carbonos quirales de D. En una forma de realización, la fracción de fármaco maitancinoide tendrá la siguiente estereoquímica:



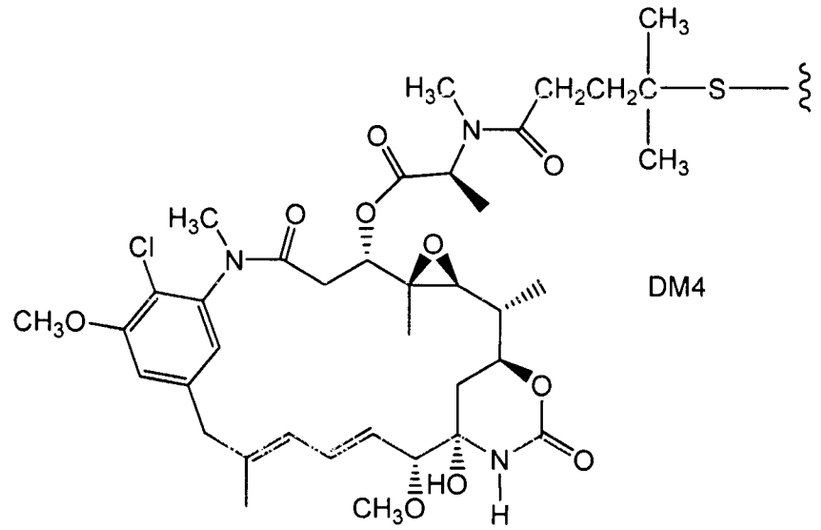
[0444] A continuación, se citan algunas formas de realización ejemplares de fracciones de fármacos maitansinoides: DM1; DM3 y DM4, con las estructuras:



DM1



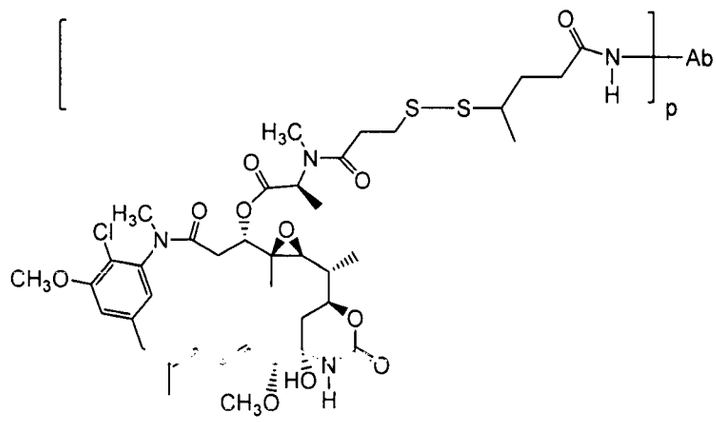
DM3



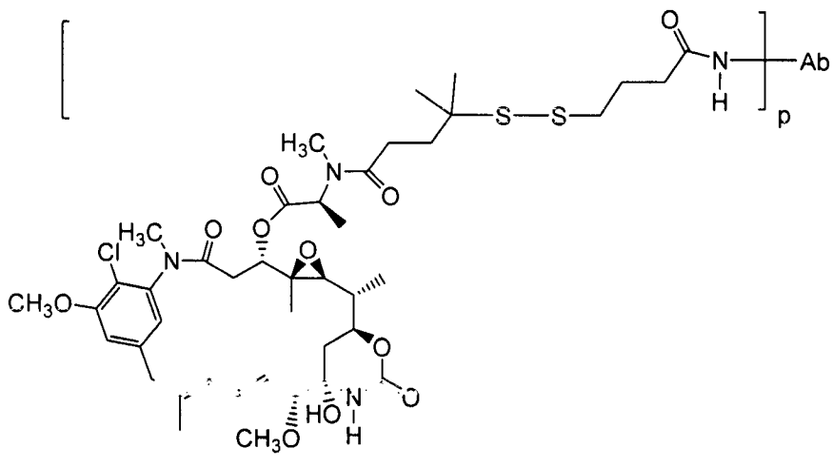
DM4

donde la línea ondulada indica el enlace covalente del átomo de azufre del fármaco a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco. (WO 2005/037992; EE.UU. 2005/0276812 A1).

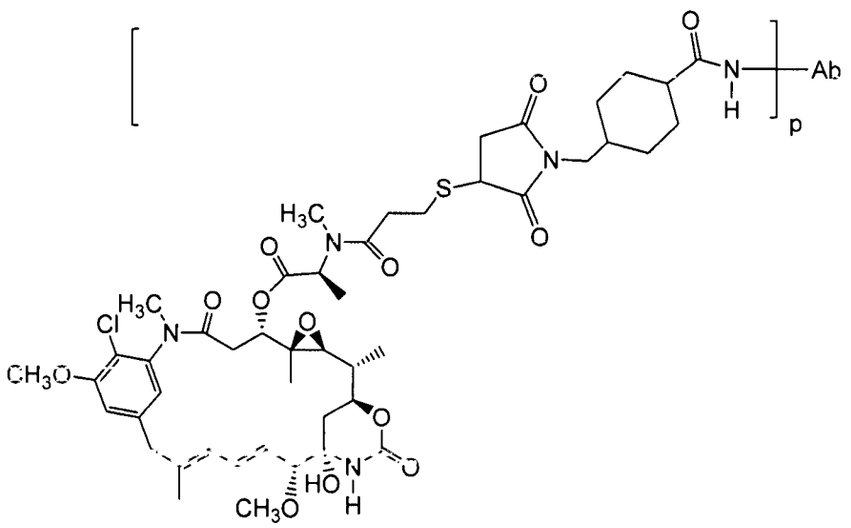
[0445] Otros conjugados ejemplares de anticuerpo con fármacos maitansinoides tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde Ab es el anticuerpo y p es de 1 a alrededor de 8):



Ab -SPP-DM1

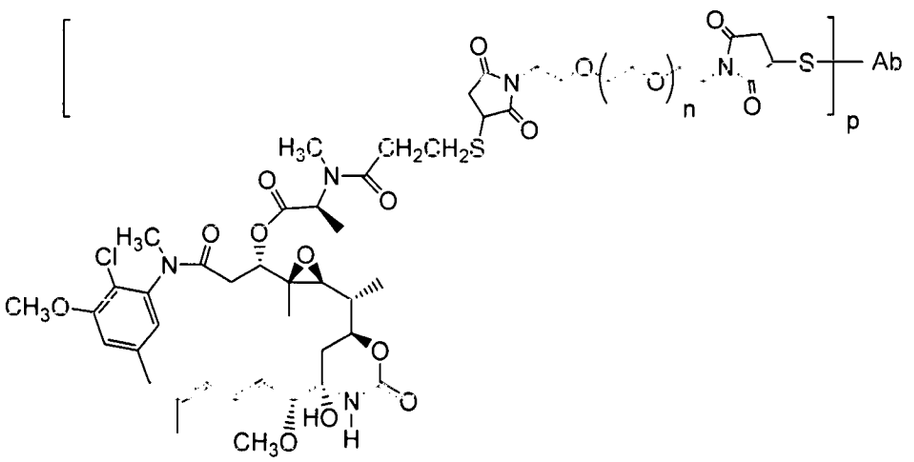


Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

[0446] Los conjugados ejemplares de un anticuerpo con fármacos donde DM1 se enlaza a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



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

[0447] Por ejemplo, los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para realizar los mismos y sus usos terapéuticos se desvelan en Ericlson y col. (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433; patentes de EE.UU. números 5.208.020, 5.416.064, y 2005/0276812 y en la patente europea EP 0 425 235 B1, y los descubrimientos de las mismas se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

[0448] Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan enlazando por vía química un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin hacer que disminuya significativamente la actividad biológica de la molécula del anticuerpo o de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.208.020 (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo

234

de referencia). Se pueden sintentizar los maitansinoides mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Se revelan maitansinoides apropiados, por ejemplo en la patente de EE.UU. No. 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones que no son patentes mencionadas en esta memoria descriptiva, como maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático y otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como varios ésteres de maitansinol.

[0449] Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados de anticuerpos con maitansinoides, incluidos, por ejemplo, los descritos en la patente de EE.UU. No. 5208020 o patente europea 0 425 235 B1, Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) y en la patente de EE.UU. No. 2005/0169933 A1, y lo descrito en los mismos se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar como se indica en EE.UU. 2005/0276812 A1, :Antibody-drug conjugates and methods" ("Conjugados anticuerpo-fármaco y métodos"). Los grupos enlazadores comprenden grupos bisulfuro, grupos de tioéteres, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la esterasa, como se revela en las patentes identificadas anteriormente. En la presente memoria descriptiva se dan ejemplos y se describen grupos enlazadores adicionales.

[0450] Los conjugados del anticuerpo y del maitansinoide se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). En algunas formas de realización, el agente de acoplamiento es N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson y col., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) o N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace bisulfuro.

[0451] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo del enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas convencionales de acoplamiento. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tenga un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tenga un grupo hidroxilo. En una forma de realización, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

(2) Auristatinas y dolastatinas

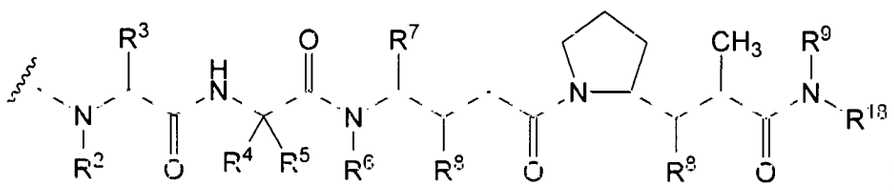
[0452] En algunas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatina o un análogo o derivado peptídico de ésta, por ejemplo, una auristatina (patentes de EE.UU. números 5635483; 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP y la división nuclear y celular (Woyke y col., (2001)

235

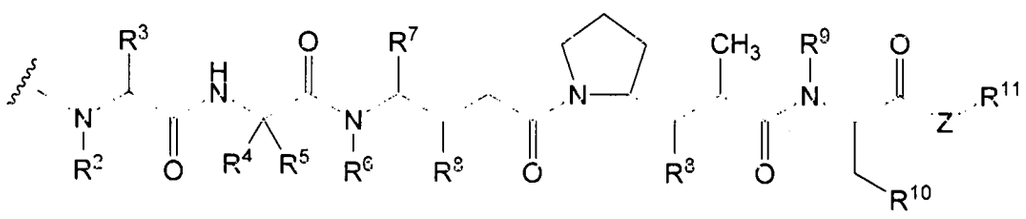
Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tiene actividad antineoplásica (patente de EE.UU. No. 5663149) y antimicótica (Pettit y col., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:2961-2965). La porción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) o C (carboxil) de la porción peptídica del fármaco (WO 02/088172).

[0453] Entre las formas de realización ejemplares de auristatina están las fracciones DE y DF de fármacos de monometilauristatina enlazados al extremo terminal N (patente de EE.UU. No. 2005/0238649, descritas en Senter y col., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volumen 45, Resumen No. 623, presentada el 28 de marzo de 2004, cuyo contenido se incluye expresamente en su totalidad a modo de referencia).

[0454] Se puede seleccionar una fracción de fármaco peptídico de las Fórmulas D_E y D_F a continuación:



D_E



D_F

donde la línea ondulada de D_E y D_F indican el sitio de la unión covalente a un anticuerpo o componente enlazador de anticuerpo e independientemente en cada lugar:

R^2 se selecciona de H y C_1-C_8 alquilo;

R^3 se selecciona de H, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo, arilo, C_1-C_8 alquil-arilo, C_1-C_8 alquilo-(C_3-C_8 carbociclo), C_3-C_8 heterociclo y C_1-C_8 alquil-(C_3-C_8 heterociclo);

R^4 se selecciona de H, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo, arilo, C_1-C_8 alquil-arilo, C_1-C_8 alquilo-(C_3-C_8 carbociclo), C_3-C_8 heterociclo y C_1-C_8 alquil-(C_3-C_8 heterociclo);

R^5 se selecciona de H y metilo;

o R^4 y R^5 conjuntamente forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de H, C_1-C_8 alquilo y C_3-C_8 carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona de H y C_1-C_8 alquilo;

R^7 se selecciona de H, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo, arilo, C_1-C_8 alquil-arilo, C_1-C_8 alquilo-(C_3-C_8 carbociclo), C_3-C_8 heterociclo y C_1-C_8 alquil-(C_3-C_8 heterociclo);

cada R^8 se selecciona independientemente de H, OH, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo y O-(C_1-C_8 alquilo);

R^9 se selecciona de H y C_1-C_8 alquilo;

R^{10} se selecciona de arilo o C_3-C_8 heterociclo;

Z es O, S, NH, o NR^{12}, donde R^{12} es C_1-C_8 alquilo;

R^{11} se selecciona de H, C_1-C_{20} alquilo, arilo, C_3-C_8 heterociclo, -$(R^{13}O)_m$-R^{14}, o -$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$;

m es un número entero comprendido entre 1 y 1.000;

R^{13} es C_2-C_8 alquilo;

R^{14} es H o C_1-C_8 alquilo;

cada caso de R^{15} es independientemente H, COOH, $-(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n$-SO_3H, o $-(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_8 alquilo;

cada caso de R^{16} es independientemente H, C_1-C_8 alquilo, o $-(CH_2)_n$-COOH;

R^{18} se selecciona de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$-arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3$-C_8 heterociclo) y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3$-C_8 carbociclo) y

n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

[0455] En una forma de realización, R^3, R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es –H o metilo. En una forma ejemplar de realización, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es -H y R^7 es sec-butilo.

[0456] En otra forma de realización, R^2 y R^6 son cada uno metilo y R^9 es -H.

[0457] Todavía en otra forma de realización, cada caso de R^8 es $-OCH_3$.

[0458] En una forma ejemplar de realización, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es -H, R^7 es sec-butilo, cada caso de R^8 es $-OCH_3$ y R^9 es -H.

[0459] En una forma de realización, Z es -O- o -NH-.

[0460] En una forma de realización, R^{10} is arilo.

[0461] En una forma ejemplar de realización, R^{10} es fenilo.

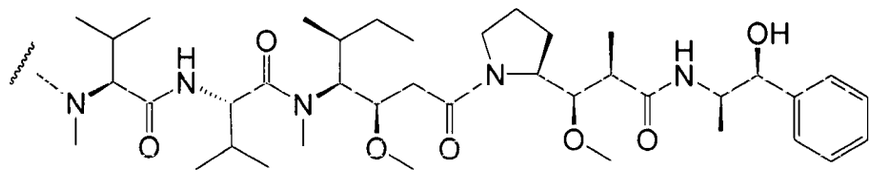
[0462] En una forma ejemplar de realización, cuando Z es -O-, R^{11} es -H, metilo o t-butilo.

[0463] En una forma de realización, cuando Z es -NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$ y R^{16} es $-C_1$-C_8 alquilo o $-(CH_2)_n$-COOH.

[0464] En otra forma de realización, cuando Z es -NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_n$-SO_3H.

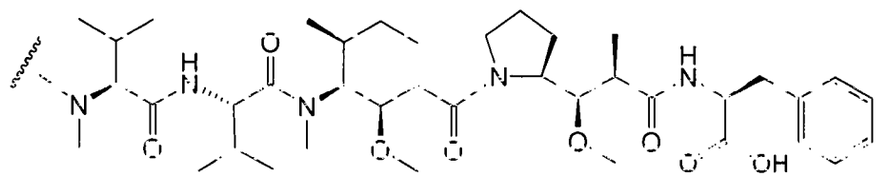
[0465] Una forma ejemplar de realización con auristatina de la fórmula D_E es MMAE, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco:

237



MMAE

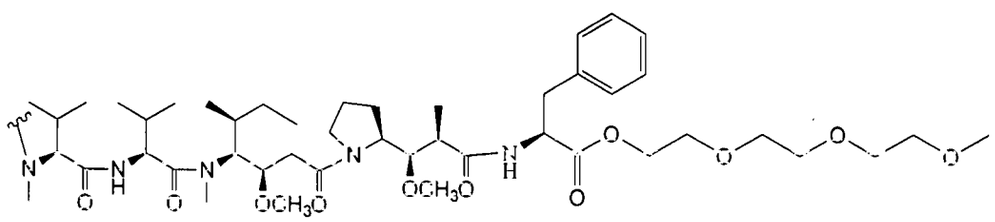
[0466] Una forma ejemplar de realización con auristatina de la fórmula D_F es MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco (*véase* EE.UU. 2005/0238649 y Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):



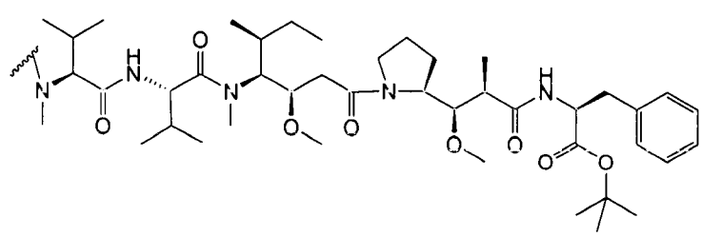
MMAF

[0467] Otras porciones ejemplares incluyen compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones fenilalanina carboxi en el extremo terminal C de la porción de fármaco auristatina pentapéptido (documento WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de la cadena lateral de fenilalanina en el extremo terminal C de la porción de fármaco auristatina pentapéptido (documento WO 2007/008603).

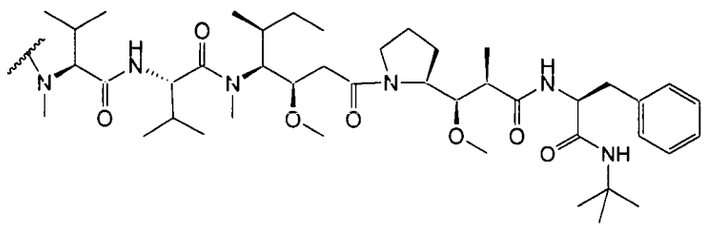
[0468] Otras fracciones de fármaco incluyen los siguientes derivados de MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco:

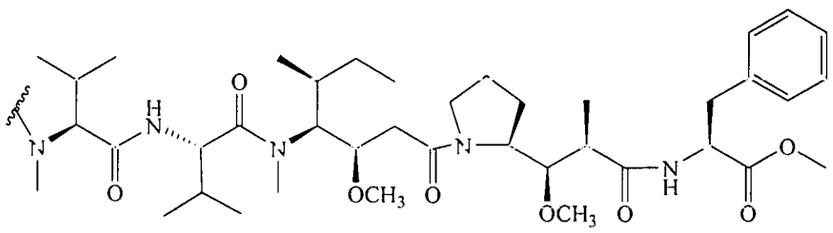


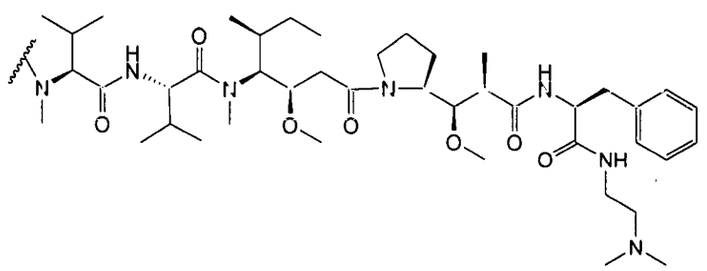
,

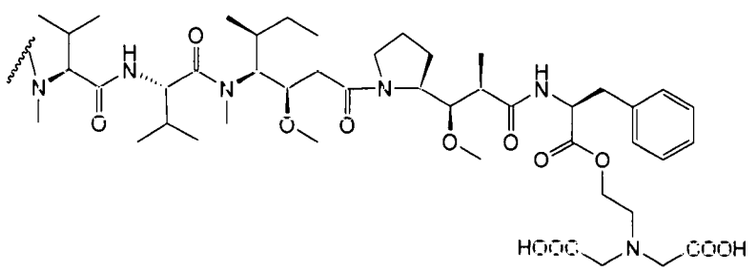


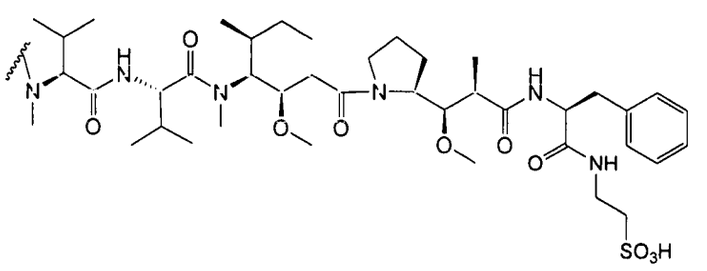
,

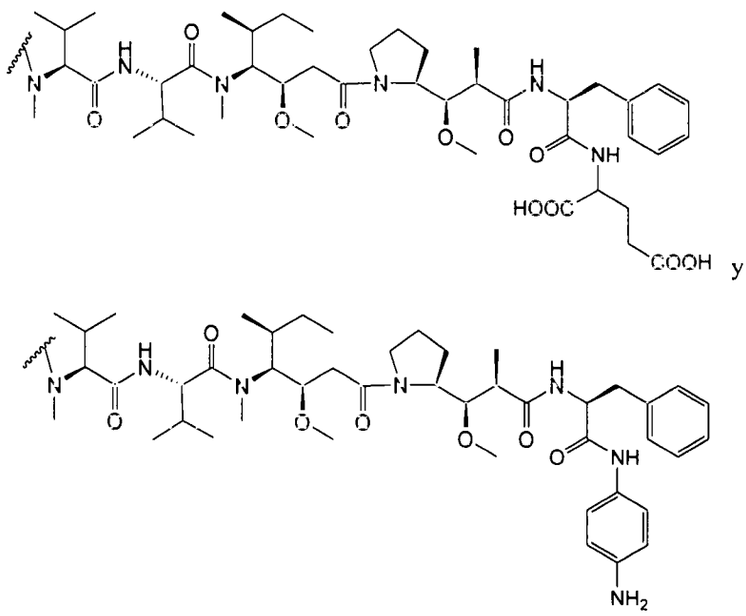








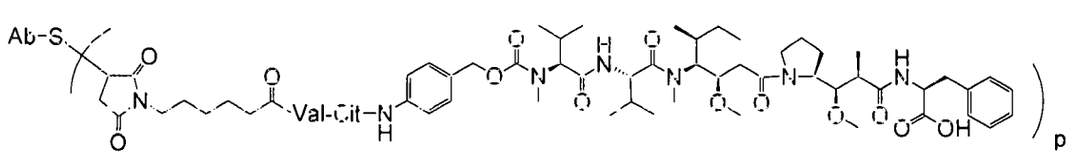




y

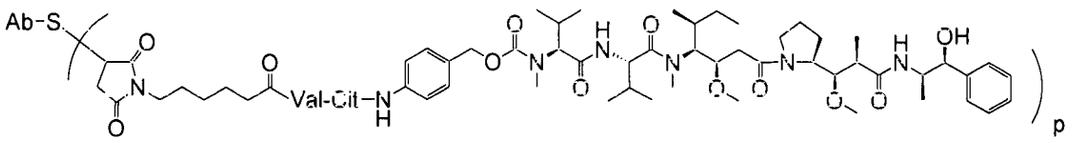
[0469] En un aspecto, los grupos hidrófilos que incluyen ésteres de glicol trietileno (TEG), pero que no están limitados a éstos, como se muestra anteriormente, se pueden unir a la fracción del fármaco en R^{11}. Sin estar obligados por una teoría concreta, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y no aglomeración de la fracción del fármaco.

[0470] Las formas ejemplares de realización de los ADC de la Fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o un derivado de la misma se describen en la patente de EE.UU. No. 2005-0238649 y en Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124, que se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Las formas ejemplares de realización de los ADC de Fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras y abreviaciones (donde "Ab" es un anticuerpo; p está comprendido entre 1 y 8 aproximadamente, "Val-Cit" o "vc" es un dipéptido valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre. Se hará notar que en ciertas descripciones estructurales del azufre enlazado a ADC descrito en la memoria descriptiva, el anticuerpo se representa como "Ab-S" simplemente para indicar la característica de enlace del azufre y no para indicar que un átomo específico de azufre posea fracciones enlazadoras de múltiples fármacos. Los paréntesis a la izquierda que permanecen en las siguientes estructuras pueden ser también colocados a la izquierda del átomo de azufre, entre Ab y S, lo que sería una descripción equivalente del ADC de la invención descrita a través de esta memoria descriptiva.

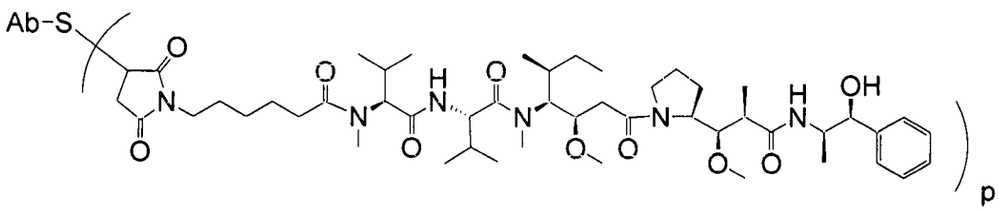


240

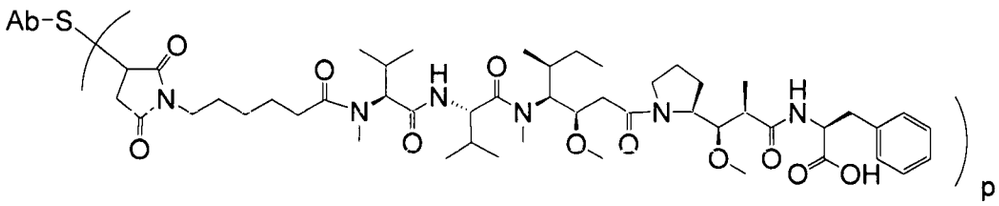
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0471] Las formas ejemplares de realización de los ADC de Fórmula I que comprenden MMAF y varios componentes enlazadores incluyen, además, Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Es interesante señalar que se ha demostrado que los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador que no sea proteolíticamente escindible poseen una actividad similar a la de los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador proteolíticamente escindible. *Véase* Doronina y col., (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. En tales instancias, se considera que la liberación del fármaco se efectúa mediante la degradación del anticuerpo en la célula. *Id.*

[0472] Por lo general, las porciones del fármaco basadas en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre uno o más fragmentos de aminoácidos o péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", vol. 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los siguientes métodos de: patente de EE.UU. No. 2005-0238649 A1; patente de EE.UU. No. 5635483; patente de EE.UU. No.5780588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863 y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

241

[0473] En general, las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_F, como MMAF y derivados de lo mismo, se pueden preparar utilizando los métodos descritos en la patente de los EE.UU. 2005-0238649 A1 y Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Las fracciones de los fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_E, como MMAE y derivados de los mismos, se pueden preparar utilizando los métodos descritos en Doronina y col. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. Las fracciones de enlazador-fármaco MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE se pueden sintetizar de forma conveniente mediante métodos habituales, por ejemplo, como se describe en Doronina y col., (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, y la publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2005/0238649 A1, y luego conjugar con un anticuerpo de interés.

(3) Caliqueamicina

[0474] En otras formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo del nivel picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, consúltense las patentes de EE.UU. números 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, aunque sin limitarse a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG y θ^I_1 (Hinman y col., *Cancer Research*, 53:3336-3342 (1993), Lode y col., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. de American Cyanamid anteriormente mencionadas). Otro fármaco antineoplásico con el que es posible conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada con anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

c. Otros agentes citotóxicos

[0475] Otros agentes antineoplásicos que se pueden conjugar a un anticuerpo incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracil, la familia de agentes conocidos colectivamente como el complejo LL-E33288, descritos en las patentes de EE.UU. números 5.053.394, 5.770.710, al igual que las esperamicinas (patente de EE.UU. No. 5.877.296).

[0476] Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

242

[0477] La presente invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como una desoxirribonucleasa; DNasa).

[0478] En algunas formas de realización, un inmunoconjugado puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se dispone de diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radioactivos de Lu. Cuando el inmunoconjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radioactivo de estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123}, o un marcador giratorio para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (conocida también como diagnóstico por imágenes obtenidas mediante resonancia magnética, IRM), como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0479] Se pueden incorporar los marcadores radioactivos o de otra clase al inmunoconjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores como tc^{99m} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker y col., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos detalladamente.

[0480] En algunas formas de realización, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo conjugado a una enzima activadora-profármaco que convierte el profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, véase el documento WO 81/01145) a un fármaco activo, como un fármaco antineoplásico. Tales inmunoconjugados son útiles en terapias de profármaco mediadas por enzimas dependientes de anticuerpos ("ADEPT"). Las enzimas que se pueden conjugar al anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, fosfatasas alcalinas, que son útiles para convertir los profármacos que contienen fosfatasa en fármacos libres; arilsulfatasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el antineoplácico, 5-fluorouracil; proteasas, como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos, como β-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir fármacos derivados de β-lactamasa en fármacos libres; y penicilina amidasas, como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amino de grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas pueden estar unidas covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas recombinantes de ADN bien conocidas en la materia. Consúltese, por ejemplo en Neuberger y col., *Nature* 312:604-608 (1984).

d. Concentración del fármaco

[0481] La concentración del fármaco se representa mediante p y es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La concentración del fármaco puede oscilar entre 1 y 20 fracciones de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de la Fórmula I incluyen conjuntos de anticuerpos conjugados con una variedad de fracciones de fármaco, de 1 a 20. El promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC procedentes de reacciones de la conjugación se puede determinar mediante medios convencionales, como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC. Asimismo, se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en función de p. En algunos ejemplos, la separación, purificación y determinación del ADC homogéneo, donde p es un valor determinado de ADC con otras concentraciones de fármaco, se puede lograr por métodos como HPLC de fase reversa o electroforesis. Además, las formulaciones farmacéuticas de la Fórmula I de conjugados anticuerpo-fármaco pueden ser una mezcla heterogénea de estos conjugados con anticuerpos enlazados a 1, 2, 3, 4 o más fracciones de fármacos.

[0482] En el caso de algunos conjugados de anticuerpos con fármacos, p puede verse limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, como en las formas de realización ejemplares anteriores, puede que un anticuerpo sólo tenga uno o varios grupos tiol de la cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En algunas formas de realización, una concentración más alta de fármaco, por ejemplo, $p > 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpos con fármacos. En algunas formas de realización, la concentración de los fármacos para un ADC de la invención está comprendido entre 1 a alrededor de 8; desde alrededor de 2 a 6; o de alrededor de 3 a 5. En efecto, se ha demostrado que para algunos ADC, la proporción óptima de las fracciones de fármacos por anticuerpo pueden ser menores que 8 y pueden estar cerca de 2 a alrededor de 5. *Véase* patente de los EE.UU. No. 2005-0238649 A1.

[0483] En determinadas formas de realización, un número menor al máximo teórico de fracciones de fármacos se conjuga con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el enlazador-fármaco intermedio o el reactivo del enlazador, como se señala más adelante. Por lo general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tioles de la cisteína libres y reactivos que se puedan unir a una fracción de fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de la cisteína en anticuerpos están en forma de puentes bisulfuro. En determinadas formas de realización, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones totales o parciales de reducción, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En determinadas formas de realización, un anticuerpo está sujeto a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos como lisina o cisteína.

[0484] La concentración (proporción fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de distintas formas, por ejemplo: (i) limitación del exceso molar de fármaco-enlazador intermedio o reactivo

enlazador relativo al anticuerpo, (ii) limitación del tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de la cisteína.

[0485] Hay que comprender que, cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un fármaco-enlazador intermedio o con un reactivo del enlazador seguido por el reactivo de la fracción del fármaco, el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de una o más fracciones de fármaco unidas a un anticuerpo. El promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo ELISA dual con anticuerpos, que sea específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Se pueden identificar en la mezcla moléculas individuales de ADC por espectroscopia de masas y separar por medio de HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica (*véase,* , McDonagh y col., (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett y col., (2004) Clin. Cancer Res., 10:7063-7070; Hamblett, K.J., y col. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Resumen No. 624, American Association for Cancer Research, junta anual de 2004, el 27-31 de marzo, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., y col. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen No. 627, American Association for Cancer Research, junto annual de 2004, el 27-31 de marzo, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). En determinadas formas de realización, un ADC homogéneo con un único valor de concentración se puede aislar de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

c. Algunos métodos para la preparación de inmunoconjugados

[0486] Un ADC de la Fórmula I se puede preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un agente enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante una unión bivalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo nucleofílico del anticuerpo. Los métodos ejemplares de preparación de un ADC de la Fórmula I por medio de la última vía se describen en la patente de EE.UU. No. 2005-0238649 A1., que se incluye expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

[0487] Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, aunque no se limitan a: (i) grupos amino terminal N, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las fracciones del enlazador y los reactivos del enlazador, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros reducibles entre cadenas, es decir, puentes de cisteína. Se puede hacer que los anticuerpos sean reactivos para la conjugación con reactivos del enlazador

245

mediante tratamiento con un agente reductor como DTT (ditiotreitol) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de forma que el anticuerpo quede total o parcialmente reducido. Por tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la modificación de las lisinas residuales, por ejemplo, mediante reacción de residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en un anticuerpo mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando variantes de anticuerpos que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

[0488] Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también se pueden producir mediante reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, como un grupo carbonilo cetona o aldehído, con un grupo nucleofílico en un fármaco o reactivo enlazador. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo enlazador se incluyen, aunque no se limitan a, hidracida, oxima, amina, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una forma de realización, un anticuerpo se modifica para introducir fracciones electrófilas que puedan reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el fármaco o reactivo enlazador. En otra forma de realización, los azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amino de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o se pueden reducir, por ejemplo mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amino estables. En una forma de realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) en el anticuerpo que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina en la terminal N pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que resulta en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; patente de EE.UU. No. 5362852). Se puede hacer que este aldehído reaccione con una fracción de fármaco o un nucleófilo enlazador.

[0489] Los grupos nucleófilos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos, pero no están limitados a: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y grupos de aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

[0490] Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no están limitados a, el ADC preparado con los reactivos reticulares siguientes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están

disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; véanse páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog).

[0491] Los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también se pueden preparar utilizando diversos agentes de unión a proteínas bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como HCl de dimetiladipimidato), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta y col., *Science* 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0492] Alternativamente, se puede realizar una fusión de proteínas que contengan un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede incluir regiones que codifiquen el anticuerpo y las porciones citotóxicas del conjugado, ya sean adyacentes entre sí o en forma separada por una región que codifique un péptido del enlazador, el cual no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

[0493] En otra forma de realización, un anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (como la estreptavidina) para actuar preliminarmente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor del anticuerpo, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Inmunoconjugados ejemplares: Conjugados de anticuerpo-thio con fármacos

a. Preparación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína

[0494] El ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína y anticuerpos anti-CD79b parentales de la invención se prepara mediante diversos métodos, entre los cuales se encuentran, aunque no limitados a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de los aminoácidos de producción natural) y la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos) (Carter (1985) y col., Nucleic Acids Res., 13:4431-4443, Ho y col., (1989), Gene, (Amst.) 77:51-59, Kunkel y col., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 y Liu y col., (1998), J. Biol. Chem., 273:20252-20260), mutagénesis por PCR (Higuchi (1990), en PCR Protocols, páginas 177-183, Academic Press, Ito y col., (1991), Gene, 102:67-70, Bernhard y col., (1994), Bioconjugate Chem., 5:126-132 y Vallette y col., (1989), Nuc. Acids Res., 17:723-733) y mutagénesis por inserción de un casete (Wells y col., (1985), Gene, 34:315-323) de un

247

ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Los protocolos, kits y reactivos de mutagénesis se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigido a múltiples sitios QuikChange© (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones individuales también se generan mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos utilizando plásmidos de ADN de doble cadena como plantilla mediante mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Zoller y col., (1983), Methods Enzymol. 100:468-500 y Zoller, M.J. y Smith, M. (1982), Nucl. Acids Res. 10:6487-6500). Además, se pueden construir variantes de anticuerpos recombinantes mediante la manipulación de un fragmento de restricción o PCR de ampliación solapada con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la(s) sustitución(es) de codones de cisteína. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis estándar para generar ADN que codifique dichos anticuerpos diseñados con cisteína mutante (Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., (1993).

[0495] Se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., (1990) Nature 348:552-553) para producir anticuerpos humanos anti-CD79b y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, del repertorio de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de los dominios V de los anticuerpos se clonan dentro de la estructura en un gen proteínico con revestimiento o bien mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola hebra del genoma del fago, las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las células B (Johnson y col., (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson y col., (1991) Nature, 352:624-628; Marks y col., (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith y col., (1993) EMBO J. 12:725-734; patente de EE.UU. No. 5565332; patente de EE.UU. No. 5573905; patente de EE.UU. No. 5567610; patente de EE.UU. No. 5229275).

[0496] Los anticuerpos anti-CD79b se pueden sintetizar químicamente utilizando metodologías de síntesis de oligopéptidos conocidas o se pueden preparar y purificar mediante tecnología recombinante. Se puede producir una secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (Steward y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Se puede realizar la síntesis de proteínas *in vitro* utilizando técnicas manuales o automatizadas. Se puede lograr la síntesis automatizada durante la fase sólida, por ejemplo, al emplear aminoácidos protegidos con t-BOC o Fmoc y al utilizar un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente diversas porciones del anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b por separado y combinadas utilizando métodos químicos o enzimáticos a fin de producir el anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b deseado.

[0497] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (Morimoto y col., (1992), Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 y Brennan y col., (1985), Science, 229:81) o se producían directamente mediante células huésped recombinantes. Todos los fragmentos Fab, Fv y SCFv de los anticuerpos anti-CD79b se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas en la presente memoria descriptiva. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y emparejarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., (1992) Bio/Technology 10:163-167), o pueden aislarse directamente de cultivos de células anfitrión recombinantes. Los anticuerpos anti-CD79b pueden ser un fragmento Fv de cadena única (scFv) (documento WO 93/16185; patente de EE.UU. No. 5571894; patente de EE.UU. No. 5587458). El fragmento del anticuerpo anti-CD79b también puede ser un "anticuerpo lineal" (patente de EE.UU. No. 5641870). Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

[0498] La siguiente descripción está relacionada principalmente con la producción de anticuerpos anti-CD79b mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b. Se pueden obtener anticuerpos anti-CD79b que codifican el ADN de una biblioteca de ADNc preparada con tejido que se estima que posee el ARNm del anticuerpo anti-CD79b y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN humano del anticuerpo anti-CD79b o polipéptido CD79b se puede obtener oportunamente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante los procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada del ácido nucleico).

[0499] Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten la creación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína que reaccionan con funcionalidad electrófila. Estos métodos, además, permiten compuestos de conjugados de anticuerpos como los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) con moléculas de fármaco en sitios designados, diseñados y selectivos. Los residuos reactivos de cisteína en la superficie de un anticuerpo permiten específicamente conjugar una porción del fármaco utilizando un grupo tiol reactivo, por ejemplo, maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad del tiol de un residuo de Cys con un grupo maleimido es aproximadamente 1.000 veces mayor que cualquier otra funcionalidad aminoacídica de una proteína, como por ejemplo, el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino del extremo N terminal. La funcionalidad del tiol específica en los reactivos yodoacetilos y maleimidos puede reaccionar con grupos aminos, sin embargo, se requieren tiempos de reacción mayores y niveles de pH superiores (>9,0) (Garman (1997), Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres). Se puede calcular la cantidad de tiol libre en una proteína mediante la prueba estándar de Ellman. La inmunoglobulina M es un ejemplo de pentámero enlazado con bisulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una proteína con

249

puentes de bisulfuro internos que enlazan las subunidades. En proteínas como éstas, se requiere la reducción de los enlaces de bisulfuro con un reactivo como ditiotreitol (DTT) o selenol (Singh y col., (2002), Anal. Biochem., 304:147-156) para generar el reactivo de tiol libre. Este enfoque puede dar como resultado la pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y la especificidad de unión al antígeno.

[0500] El ensayo PHESELECTOR (ELISA fago para la selección de tioles reactivos) permite la detección de grupos de cisteína reactiva en anticuerpos en un formato de fago para ELISA para ayudar así en el diseño de los anticuerpos construidos con cisteína (Junutula, J.R., y col., (2008) J Immunol Methods 332:41-52; WO 2006/034488; patente de EE.UU. No. 2007/0092940). El anticuerpo diseñado con cisteína es revestido en las superficies de los pocillos, seguido por la incubación con partículas de fago, la adición de anticuerpo secundario etiquetado HRP y la detección de la absorbancia. Las proteínas mutantes que se expresan en el fago se pueden examinar mediante un método rápido, sólido y de alto rendimiento. Las bibliotecas de anticuerpos diseñados con cisteína se pueden producir y someter a selección de unión utilizando el mismo método para diferenciar de forma apropiada los sitios reactivos de incorporación de Cys libre de las bibliotecas aleatorias de proteínas-fagos de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye proteínas mutantes que reaccionan con cisteína representadas en fagos con un reactivo de afinidad o un grupo indicador que también es reactivo al tiol.

[0501] El ensayo PHESELECTOR permite tamizar grupos tiol reactivos en los anticuerpos. La identificación mediante este método de la variante A121C es ejemplar. Es posible buscar eficazmente la totalidad de la molécula Fab para identificar más variantes ThioFab con grupos tiol específicos. Para identificar y cuantificar la accesibilidad del disolvente a los residuos de aminoácido presentes en un polipéptido se emplea una accesibilidad superficial fraccional indicativa. La accesibilidad de la superficie se puede expresar como el área de superficie ($Å^2$) que puede entrar en contacto con una molécula disolvente, por ejemplo, agua. El espacio ocupado por el agua es aproximadamente igual al de una esfera con un radio de 1,4 Å. Existe software de distribución libre o de adquisición mediante licencia (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, fax: (+44) 1925 603825, o por Internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) como la Suite CCP4 de programas de cristalografía que utiliza algoritmos para calcular el área superficial accesible de cada aminoácido de una proteína con coordenadas conocidas derivadas de la cristalografía de rayos X ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Dos módulos ejemplares de software que realizan cálculos del área superficial accesible son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B. Lee y F.M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400. AREAIMOL define el área superficial accesible al solvente de un proteína como el locus del centro de una esfera de prueba (que representa una molécula de solvente) mientras que rueda sobre la superficie Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula el área superficial accesible del disolvente generando puntos superficiales en una esfera ampliada sobre cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los radios del átomo y la sonda) y eliminando aquellos que se encuentran dentro de las esferas equivalentes asociadas a los átomos adyacentes. AREAIMOL encuentra el área de átomos accesible al disolvente en un archivo coordinado PDB y resume

la zona accesible por residuo, por cadena y para la totalidad de la molécula. Las áreas accesibles (o diferencias de área) para átomos individuales se pueden escribir en un archivo de salida seudo-PDB. AREAIMOL asume un radio único para cada elemento y sólo reconoce una cantidad limitada de elementos diferentes.

[0502] AREAIMOL y SURFACE brindan información sobre áreas accesibles absolutas, es decir, el número de Angstroms cuadrados (Å). La accesibilidad superficial fraccional se calcula mediante referencia a un estado estándar aplicable a un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es un tripéptido Gly-X-Gly, donde X es el aminoácido de interés y el estado de referencia debería ser una 'conformación 'ampliada', es decir, como la de las hebras beta. La conformación ampliada maximiza la accesibilidad de X. La zona accesible calculada se divide por la zona accesible en un estado de referencia de un tripéptido Gly-X-Gly e indica el cociente, que es la accesibilidad fraccional. El porcentaje de accesibilidad es igual a la accesibilidad fraccional multiplicada por 100. Otro algoritmo ejemplar para calcular el área superficial accesible se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broker, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), que calcula el área superficial accesible de un residuo de aminoácido a una esfera de agua basada en las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad superficial fraccional para cada aminoácido en un anticuerpo se puede calcular utilizando información disponible sobre la estructura del cristal (Eigenbrot y col., (1993) J Mol Biol. 229:969-995).

[0503] Se aísla fácilmente el ADN que codifica los anticuerpos diseñados con cisteína y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan con células huésped como células de E. coli, células COS de monos, células de ovario de hámster chino (CHO) u otras células huésped de mamíferos, tales como células de mieloma (patente de EE.UU. No. 5807715 y solicitudes de patentes de EE.UU. 2005/0048572 y 2004/0229310) que, de otro modo, no producen la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

[0504] Luego del diseño y la selección, los anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, ThioFabs diseñados con los residuos de Cys altamente reactivos e independientes, se pueden reproducir por: (i) expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo, E. coli (Skerra y col., (1993), Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 y Plückthun (1992), Immunol. Revs., 130:151-188) o un sistema de cultivo de células de mamíferos (documento WO 01/00245), por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), y (ii) purificación utilizando técnicas comunes de purificación de proteínas (Lowman y col., (1991), J. Biol. Chem., 266(17):10982-10988).

[0505] Los grupos tiol de cisteína diseñada reaccionan con reactivos enlazadores electrófilos y enlazadores a fármaco intermedios para formar conjugados de anticuerpos diseñados con cisteína con fármacos y otros anticuerpos marcados diseñados con cisteína. Los residuos de cisteína de los anticuerpos diseñados con cisteína, presentes en los anticuerpos parentales, que están emparejados y forman enlaces

201

bisulfuro intercadena e intracadena no tienen ningún grupo tiol específico (a menos que se traten con un agente reductor) y no reaccionan con los reactivos enlazadores electrófilos o los intermediarios de fármaco-enlazador. Los residuos de cisteína recientemente diseñados pueden permanecer independientes y son capaces de reaccionar, es decir de conjugarse, con un reactivo enlazador electrófilo o un intermediario de fármaco-enlazador, como por ejemplo un fármaco-maleimida. Entre los intermediarios de fármaco-enlazador se encuentran: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones de estructura de los residuos diseñados con cisteína de las cadenas pesadas y ligeras se enumeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se relaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que comienza en el extremo N terminal, pero se diferencia del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) por inserciones marcadas con a, b, c. Utilizando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o CDR del domino variable o una inserción en ellas. Los diferentes sitios de la cadena pesada diseñada con cisteína se identifican mediante los esquemas de numeración secuencial y de numeración de Kabat.

[0506] En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

(a) la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD79b parental por cisteína y

(b) la determinación de la reactividad del tiol de la cisteína del anticuerpo anti-CD79b diseñado mediante la reacción de dicho anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo del tiol.

[0507] El anticuerpo diseñado con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.

[0508] Los residuos de aminoácidos libres de cisteína se pueden situar en las cadenas pesada o ligera, o en los dominios constante o variable. Los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, se pueden diseñar también con uno o más aminoácidos con cisteína que sustituyan a los aminoácidos del fragmento del anticuerpo para formar fragmentos del anticuerpo diseñados con cisteína.

[0509] Otra forma de realización de la invención proporciona un método de preparación (realización) de un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína, que comprende:

(a) la introducción de uno o más aminoácidos con cisteína en un anticuerpo anti-CD79b parental para generar el anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína, y

(b) determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo que reacciona al tiol;

donde el anticuerpo diseñado con cisteína más reactivo que el anticuerpo original con el reactivo que reacciona al tiol.

El paso (a) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

252

(i) mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifique el anticuerpo diseñado con cisteína;

(ii) expresión del anticuerpo diseñado con cisteína y

(iii) aislamiento y purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

[0510] El paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender la expresión de dicho anticuerpo en una partícula viral seleccionada a partir de un fago o una partícula fagémida.

[0511] El paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína también puede comprender:

(i) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad reactiva al tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína y marcado con afinidad y

(ii) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

[0512] Otra forma de realización de la invención es un método de tamizaje de los anticuerpos diseñados con cisteína con aminoácidos de cisteína no pareados altamente reactivos para detectar la reactividad del tiol que comprende:

(a) la introducción de uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo parental para generar un anticuerpo diseñado con cisteína,

(b) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad reactivo al tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína y marcado con afinidad y

(c) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína y marcado con afinidad a un medio de captura y

(d) determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína con el reactivo del tiol.

[0513] El paso (a) del método de tamizaje de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

(i) mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifique el anticuerpo diseñado con cisteína;

(ii) expresión del anticuerpo diseñado con cisteína y

(iii) aislamiento y purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

[0514] El paso (b) del método de tamizaje de anticuerpos diseñados con cisteína puede comprender la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína en una partícula viral seleccionada de un fago o una partícula fagémida.

[0515] El paso (b) del método de tamizaje de un anticuerpo diseñado con cisteína también puede comprender:

(i) la reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad reactiva al tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína marcado con afinidad y

(ii) la medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína marcado por afinidad a un medio de captura.

b. Diseño de cisteína de variantes IgG anti-CD79b

[0516] Se introdujo cisteína en una cadena pesada 118 (numeración EU) (equivalente a la posición 118 de la cadena pesada, numeración secuencial) en sitio de los anticuerpos quiméricos parentales monoclonales anti-CD79b de longitud completa o en la cadena ligera 205 (numeración de Kabat) (equivalente a la posición 210 de la cadena ligera, numeración secuencial) sitio de los anticuerpos quiméricos parentales monoclonales de los anticuerpos anti-CD79b de longitud completa por los métodos de diseño de cisteína descritos en esta memoria descriptiva.

[0517] Los anticuerpos de cisteína diseñados con cisteína en la cadena pesada 118 (numeración EU) generados fueron: (a) thio-hu2F2.D7-HC(A118C) con una secuencia de cadena pesada (identificador de secuencia no.: 85) y de la cadena ligera (identificador de secuencia no.: 86), Figura 17.

[0518] Los anticuerpos de cisteína diseñados con cisteína en la cadena ligera 205 (numeración de Kabat) generados fueron: (a) thio-hu2F2.D7-LC(V205C) con una secuencia de cadena pesada (identificador de secuencia no.: 87) y de la cadena ligera (identificador de secuencia no.: 88), Figura 18.

[0519] Estos anticuerpos monoclonales diseñados con cisteína se expresaron en CHO (células de ovarios de hámster chino) a través de la fermentación transitoria en medios que contienen 1 mM de cisteína.

[0520] Según una forma de realización, los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 humanizados comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena pesada de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (identificadores de secuencia nos.: 91-99, Tabla 2).

Tabla 2: Comparación de las numeraciones secuencial, de Kabat y EU de la cadena pesada para variantes de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 humanizados

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

[0521] Según una forma de realización, los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 quiméricos comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena pesada de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (identificadores de secuencia nos.: 100-108, Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de las numeraciones secuencial, de Kabat y EU de la cadena pesada para variantes de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína ch2F2:

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

[0522] Según una forma de realización, los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 humanizados comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena ligera de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (identificadores de secuencia nos.: 109-115, Tabla 4).

Tabla 4: Comparación de las numeraciones secuencial y de Kabat de la cadena ligera para variantes de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 humanizados

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN DE KABAT	Identificador de secuencia no.:
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	109
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	110
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	111
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	112
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	113
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	114
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	115

[0523] Según una forma de realización, los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 quiméricos comprenden una o más de las siguientes secuencias de cadena ligera de la región variable con un aminoácido de cisteína libre (identificadores de secuencia nos.: 116-122, Tabla 5).

Tabla 5: Comparación de las numeraciones secuencial y de Kabat de la cadena ligera para variantes de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína 2F2 quimérica

SECUENCIA	NUMERACIÓN SECUENCIAL	NUMERACIÓN DE KABAT	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA NO.:
TLSVTCGQPAS	I15C	I15C	116
EIKRTCAAPSV	V115C	V110C	117
TVAAPCVFIFP	S119C	S114C	118
FIFPPCDEQLK	S126C	S121C	119
DEQLKCGTASV	S132C	S127C	120
VTEQDCKDSTY	S173C	S168C	121
GLSSPCTKSFN	V210C	V205C	122

c. Anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína marcada

[0524] Los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína se pueden ubicar o acoplar específicamente eficazmente con un reactivo del tiol. El reactivo del tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo del marcador de captura, es decir, de afinidad (por ejemplo, un reactivo enlazador de biotina), un marcador de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización de fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio) o un intermediario fármaco-enlazador. Un ejemplo de reactivo del tiol es la N-etilmaleimida (NEM). En una forma de realización ejemplar, la reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un ThioFab biotinilado por medio del cual se puede detectar y medir la presencia y la reactividad del residuo diseñado con cisteína. La reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un ThioFab con un enlazador funcionalizado que puede reaccionar también con un reactivo de fracciones de fármacos u otro marcador. La reacción de un ThioFab con un intermediario fármaco-enlazador proporciona un conjugado de ThioFab con fármacos.

[0525] Los métodos ejemplares descritos en la presente memoria descriptiva se pueden aplicar generalmente para la identificación y producción de anticuerpos, y de forma más general, a otras proteínas mediante la aplicación de las fases de diseño y detección descritas en la presente memoria descriptiva.

[0526] Dicho enfoque se puede aplicar a la conjugación de otros reactivos del tiol en la que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una iodoacetamida, un piridil bisulfuro u otra molécula de

2537

conjugación de los reactivos del tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook: of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2, Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, Londres, Means (1990), Bioconjugate Chem., 1:2 y Hermanson, G. en Bioconjugate Techniques (1996), Academic Press, San Diego, páginas 40-55, 643-671). El reactivo del tiol puede ser una porción de fármaco, un fluoróforo como por ejemplo un tinte fluorescente como la fluoresceína o rodamina, un agente quelante para un diagnóctico por imágenes o un metal radioterapéutico, una marca peptidil o no peptidil o una marca de detección, o un agente modificador de la eliminación, como por ejemplo diversos isómeros del polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipófilo.

d. Usos de los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína

[0527] Los anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína y sus conjugados se pueden utilizar como agentes de diagnóctico o terapéuticos. La presente invención proporciona además métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con las células B. Particularmente, la presente invención proporciona métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno de proliferación celular, como el cáncer, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. La presente invención además proporciona métodos para diagnocticar un trastorno relacionado con el CD79b o una predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como también los métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que preferentemente se unen a polipéptidos CD79b asociados a las células B.

Otra forma de realización de la presente invención está destinada a la utilización de un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad que responde a un trastorno asociado con las células B.

e. Anticuerpos diseñados con cisteína conjugados con fármacos (conjugados de anticuerpo-thio con fármacos (TDC))

[0528] Otro aspecto de la invención es un compuesto de conjugados de anticuerpos con fármacos que comprende un anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína (Ab) y una fracción del fármaco auristatina (D), donde el anticuerpo diseñado con cisteína se une por medio de uno o más aminoácidos de cisteína libres y de una fracción de enlazador (L) a D; el compuesto es de Fórmula I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad \mathbf{I}$$

donde p equivale a 1, 2, 3 ó 4 y el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental anti-CD79b por uno o más aminoácidos con cisteína libre.

[0529] Otro aspecto de la invención incluye una composición que comprende una mezcla de compuestos de fármaco-anticuerpo de Fórmula I en donde el promedio de carga de fármaco por anticuerpo es de alrededor de 2 a 5, o de alrededor de 3 a 4.

[0530] Las Figuras 17 a 18 muestran las formas de realización de conjugados de un anticuerpo anti-CD79b diseñados con cisteína con fármacos (ADC), donde una fracción del fármaco auristatina se une a un grupo diseñado con cisteína en: la cadena ligera (LC-ADC) o la cadena pesada (HC-ADC).

[0531] Entre las posibles ventajas de los conjugados de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína con fármacos se incluyen mayor seguridad (mayor índice terapéutico), parámetros de farmacocinética mejorados, se conservan los enlaces bisulfuros inter-cadenas del anticuerpo que pueden estabilizar el conjugado y conservar su conformación de unión activa, se definen los sitios de conjugación de fármacos y la preparación de conjugados de anticuerpos diseñados con cisteína con fármacos a partir de la conjugación de anticuerpos diseñados con cisteína con reactivos enlazadores de fármacos permite elaborar un producto más homogéneo.

Enlazadores

[0532] Por "enlazador", "unidad de enlace" o "enlace" se entiende una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a una fracción de un fármaco. En varias formas de realización, un enlazador se especifica como L. Un "enlazador" (L) es una porción bifuncional o multifuncional que se puede utilizar para unir una o más porciones de fármacos (D) y una unidad de anticuerpos (Ab) para formar un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC) de Fórmula I. Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) pueden prepararse convenientemente utilizando un enlazador que posee funcionalidad reactiva para unirse al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo diseñado con cisteína (Ab) puede formar un enlace con un grupo electrófilo funcional de un reactivo enlazador, una fracción del fármaco o un enlazador a fármaco intermedio.

[0533] En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que posee un grupo electrófilo que es reactivo a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente a un enlazador. Los grupos electrófilos útiles comprenden, pero no están limitados a, los grupos de maleimidas y haloacetamidas.

[0534] Los enlazadores incluyen un radical bivalente, como un alquildiil, un arileno, un heteroarileno, fracciones como: $-(CF_2)_nO(CF_2)_n-$, unidades repetitivas de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetileneoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietileneamino, Jeffamine™) y éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

[0535] Los anticuerpos diseñados con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o intermediarios fármaco-enlazador, con grupos electrófilos funcionales como la maleimida o α-halo

carbonilo, según el método de conjugación descrito en la página 766 de Klussman y col., (2004), Bioconjugate Chemistry, 15(4):765-773 y según el protocolo del ejemplo 6.

[0536] El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe" o "af"), p-aminobensiloxicarbonil ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB") y etilenoxi $-CH_2CH_2O-$ como una o más unidades repetidoras ("EO" o "PEO"). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en el sector y algunos se describen en la presente memoria descriptiva.

[0537] En una forma de realización, el enlazador L de un ADC posee la fórmula:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

en la que:

-A- es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab),

a es 0 ó 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es independientemente un número entero que oscila entre 0 y 12,

-Y- es una unidad espaciadora unida covalentemente a una porción de fármaco e

y es 0, 1 ó 2.

Unidad de extensión

[0538] Cuando está presente, la unidad de extensión (-A-), tiene la capacidad de enlazar una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (-W-). Al respecto, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una unidad de extensión. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, ya sea naturalmente o través de la manipulación química incluyen, entre otros, el sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo de hidróxilos anoméricos de un carbohidrato y el carboxil. En un aspecto, los grupos funcionales de los anticuerpos son los sulfhidrilos o aminos. Los grupos de sulfhidrilos se pueden generar mediante la reducción de un enlace bisulfuro intramolecular de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfhidrilos se pueden generar a partir de la reacción de un grupo amino de una fracción de lisina de un anticuerpo utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que produzca sulfhidrilo. En una forma de realización, un anticuerpo (Ab) posee un grupo tiol sin cisteína que puede formar un enlace con un grupo electrófilo funcional de una unidad de extensión. Las unidades ejemplares de extensión en los conjugados de Fórmula I se presentan mediante las Fórmulas II y III, donde Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como se hizo anteriormente y R^{17} es una radical bivalente seleccionada de $(CH_2)_r$, C_3-C_8 carbociclilo, $O-(CH_2)_r$, arileno, $(CH_2)_r$–arileno, –arileno–$(CH_2)_r$–, $(CH_2)_r$–(C_3-C_8 carbociclilo), (C_3-C_8 carbociclilo)–$(CH_2)_r$, C_3-C_8

260

heterociclilo, $(CH_2)_r$–(C$_3$-C$_8$ heterociclilo), –(C$_3$-C$_8$ heterociclilo)–$(CH_2)_r$–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_r$–CH_2–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–, –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–, y –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$– ; donde R^b es H, C$_1$-C$_3$ alquil, fenil o bencil; y r es independientemente un número entero entre 1 y 10.

[0539] El arileno incluye radicales de hidrocarburo aromático bivalente de 6 a 20 átomos de carbono derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema del anillo aromático. Los grupos de arileno típicos incluyen, pero no están limitados a, radicales derivados del benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

[0540] Los grupos heterociclilos incluyen un sistema de anillos en el que uno o más átomos en anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 miembros (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo con 7 a 10 miembros (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), especialmente en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley and Sons, Nueva York, desde 1950 hasta nuestros días), particularmente en los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28 y J. Am. Chem. Soc., (1960) 82:5566.

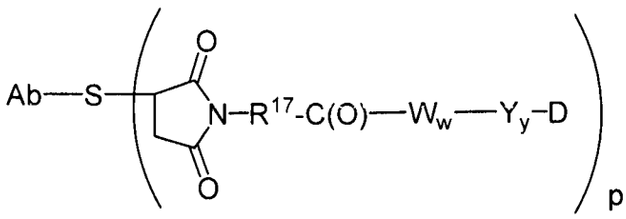
[0541] Como ejemplos de heterociclos se incluyen a modo de ejemplo sin restricción piridil, dihidropiridil, tetrahidropiridil (piperidil), tiazolil, tetrahidrotiofenil, tetrahidrotiofenil de azufre oxidado, pirimidinil, furanil, tienil, pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, benzofuranil, tianaftalenil, indolil, indolenil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, piperidinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, 2-pirrolidonil, pirrolinil, tetrahidrofuranil, bis-tetrahidrofuranil, tetrahidropiranil, bis-tetrahidropiranil, tetrahidroquinolinil, tetrahidroisoquinolinil, decahidroquinolinil, octahidroisoquinolinil, azocinil, triazinil, 6H-1,2,5-tiadiazinil, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, tienil, tiantrenil, piranil, isobenzofuranil, chromenil, xantenil, fenoxatinil, 2H-pirrolil, isotiazolil, isoxazolil, pirazinil, piridazinil, indolizinil, isoindolil, 3H-indolil, 1H-indazolil, purinil, 4H-quinolizinil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalinil, quinazolinil, cinnolinil, pteridinil, 4Ah-carbazolil, carbazolil, β-carbolinil, fenantridinil, acridinil, pirimidinil, fenantrolinil, fenazinil, fenotiazinil, furazanil, fenoxazinil, isocromanil, chromanil, imidazolidinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, piperazinil, indolinil, isoindolinil, quinuclidinil, morfolinil, oxazolidinil, benzotriazolil, benzisoxazolil, oxindolil, benzoxazolinil e isatinoil.

[0542] Los grupos carbociclilos incluyen un anillo saturado o insaturado con entre 3 y 7 átomos de carbono como monociclo o entre 7 y 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en anillo y aún con más frecuencia 5 ó 6 átomos en anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]

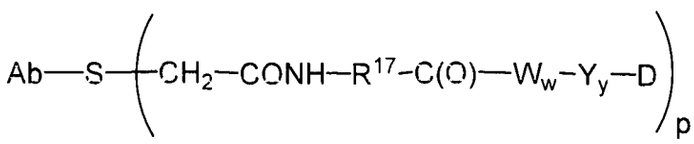
261

o de 9 a 10 átomos en anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclohexil, 1-ciclohex-1-enil, 1-ciclohex-2-enil, 1-ciclohex-3-enil, cicloheptil y ciclooctil.

[0543] Se debe comprender a partir de todas las formas de realización ejemplares de ADC de Fórmula I , como II-VI, que aún cuando no se lo denote expresamente, entre 1 y 4 fracciones de fármacos se unen a un anticuerpo (p = 1-4), dependiendo de la cantidad de residuos diseñados con cisteína.

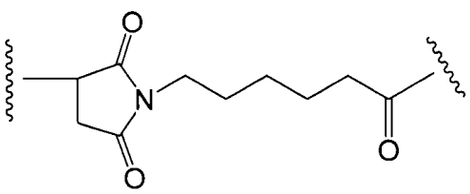


II



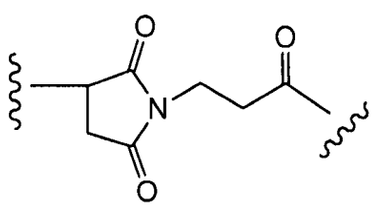
III

[0544] Una unidad de extensión ilustrativa de la Fórmula II se deriva de maleimido-caproilo (MC) en donde R^{17} es $-(CH_2)_5-$:



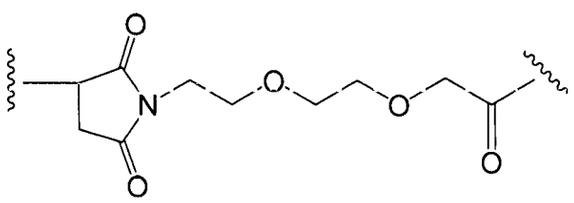
MC

[0545] Una unidad de extensión ilustrativa de la Fórmula II se deriva de maleimido-propanoilo (MC) en donde R^{17} es $-(CH_2)_2-$:



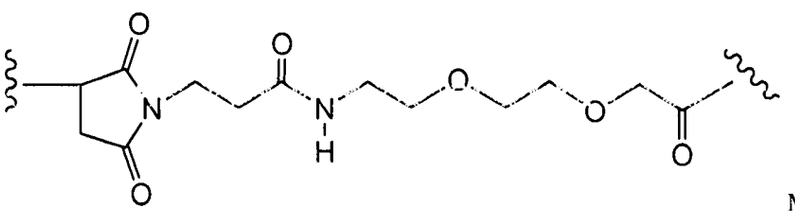
MP

[0546] Otra unidad de extensión de la Fórmula II en donde R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y r es 2:



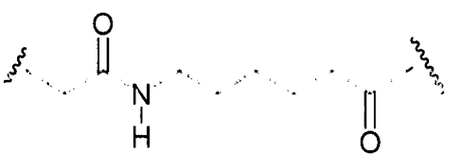
[0547] Otra unidad de extensión ilustrativa de la Fórmula II en donde R^{17} es $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ donde R^b es H y cada r es 2:

262

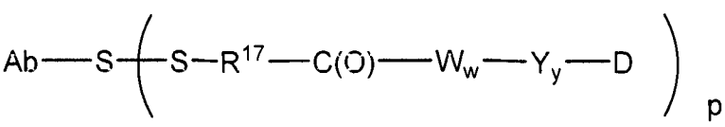


MPEG

[0548] Una unidad de extensión ilustrativa de la Fórmula III en donde R^{17} es $-(CH_2)_5-$:

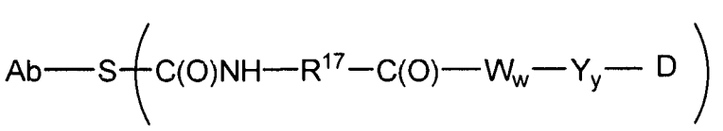


[0549] En otra forma de realización, la unidad de extensión se une al anticuerpo anti-C79b diseñado con cisteína mediante un enlace bisulfuro entre el átomo de azufre diseñado con cisteína del anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta forma de realización se describe en la Fórmula IV, en donde R^{17}, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal cual se definieron anteriormente.

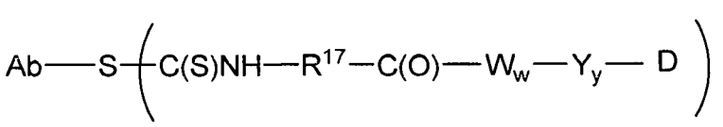


IV

[0550] En otra forma de realización, el grupo reactivo de la unidad de extensión contiene un grupo funcional de reactivos de tiol que pueden formar un enlace con un tiol con cisteína libre de un anticuerpo. Entre los ejemplos de los grupos funcionales que reaccionan con el tiol se pueden mencionar, pero no están limitados a, maleimida, α-haloacetil, ésteres activados como los ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenil, ésteres de pentafluorofenil, ésteres de tetrafluorofenil, anhídridos, cloruros de ácidos, cloruros de sulfonil, isocianatos e isotiocianatos. Unidades de extensión representativas de esta forma de realización se describen en la Fórmulas Va y Vb en donde R^{17}-, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se definieron anteriormente;



Va



Vb

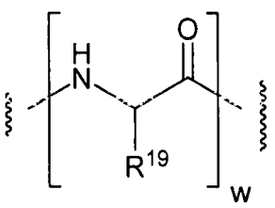
[0551] En otra forma de realización, el enlazador puede ser de tipo dendrítico para facilitar el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo mediante una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun y col., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters

43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo diseñado de cisteína sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir muchísimas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico.

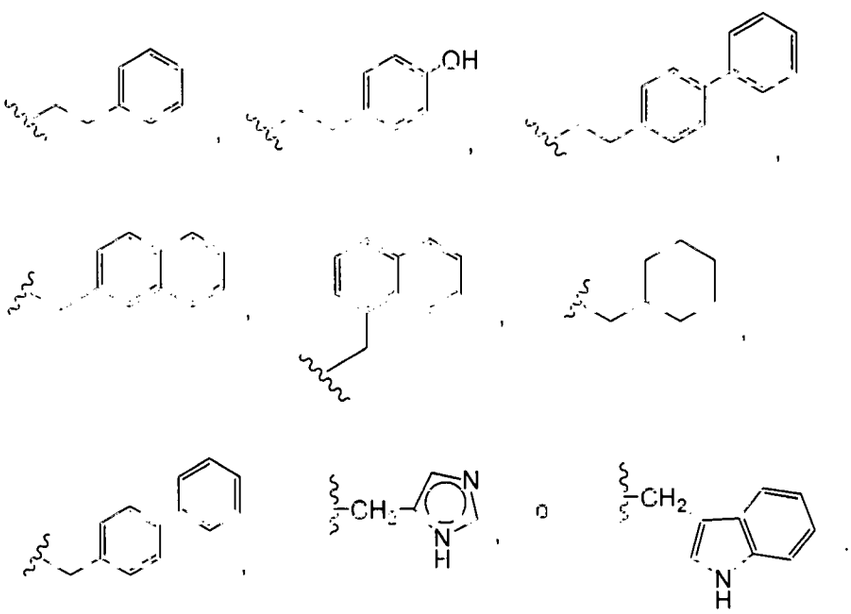
Unidad de aminoácidos

[0552] El enlazador puede incluir residuos de aminoácidos. Cuando está presente, la unidad de aminoácidos (-W_w-), enlaza al anticuerpo (Ab) con la fracción de fármaco (D) del conjugado de anticuerpo diseñado con cisteína con fármacos (ADC) de la invención.

[0553] -W_w- es una unidad dipéptida, tripéptida, tetrapéptida, pentapéptida, hexapéptida, heptapéptida, octapéptida, nonapéptida, decapéptida, undecapéptida o dodecapéptida. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácidos incluyen aquéllos que se producen de forma natural, así como también los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula que se muestra a continuación entre corchetes y w es un número entero comprendido entre 0 y 12.



donde R^{19} es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmethilo-, fenilo, ciclohexilo,



[0554] Cuando R^{19} es otro átomo en vez de hidrógeno, el átomo de carbono al cual se une R^{19} es quiral. Cada átomo de carbono al cual R^{19} se une es independiente en la configuración (S) o (R) o una mezcla racémica. Por lo tanto, las unidades de aminoácidos pueden ser enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

[0555] Las unidades de aminoácidos $-W_w-$ ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, tales como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina.

[0556] La unidad de aminoácidos se puede escindir enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a un tumor, para liberar la fracción de fármaco (-D), que en una forma de realización se protona in vivo en la liberación para proporcionar un fármaco (D). Se pueden designar y optimizar los componentes enlazadores de aminoácidos en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

Unidad espaciadora

[0557] Cuando se encuentra presente, la unidad espaciadora $(-Y_y-)$, (y = 1 ó 2), enlaza una unidad de aminoácidos $(-W_w-)$ a una fracción de fármaco (D), cuando una unidad de aminoácidos se encuentra presente (w = 1 a 12). Alternativamente, la unidad espaciadora enlaza la unidad de extensión a la porción de fármaco cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad espaciadora también une la

268

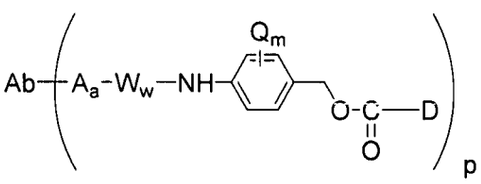
porción de fármaco a la unidad de anticuerpos cuando la unidad de aminoácidos y la unidad de extensión no están presentes (w, y = 0). Las unidades espaciadoras son de dos clases generales: autoinmoladoras y no autoinmoladoras. Una unidad espaciadora no autoinmoladora es aquella en la que la totalidad o parte de la unidad espaciadora se mantiene unida a la porción de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de anticuerpos con fármacos o del enlazador de porciones de fármaco. Cuando un ADC con una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a una célula tumoral, una proteasa asociada a una célula cancerosa o una proteasa asociada a un linfocito, una fracción de fármaco de glicina-glicina o una fracción de fármaco de glicina se separa de Ab-A_a-Ww-. En una forma de realización, una reacción de hidrólisis independiente se produce dentro de la célula objetivo, lo cual escinde el enlace de la porción de fármaco de la glicina y libera al fármaco.

[0558] En otra forma de realización, -Y_y- es una unidad de p-aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya fracción de fenileno se sustituye con Q_m donde Q es -C_1-C_8 alquilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -halógeno, - nitro o -ciano y m es un número entero comprendido entre 0 y 4.

[0559] Las formas de realización ejemplares de una unidad espaciadora no autoimmoladora (-Y-) son: -Gly-Gly- ; -Gly- ; -Ala-Phe- ; -Val-Cit- .

[0560] En una forma de realización, se proporciona un enlazador de fracciones de fármaco o un ADC en el que la unidad espaciadora está ausente (y=0) o está una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

[0561] Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmoladora puede liberar -D. En una forma de realización, -Y- es un grupo PAB enlazado a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB y está conectado directamente a -D a través de un carbonato, carbamato o grupo de éteres, donde el ADC posee la estructura ejemplar:

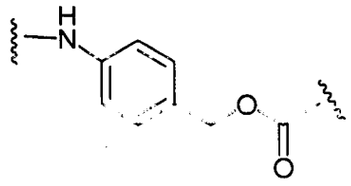


donde Q es -C_1-C_8 alquilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero entre 0 y 4; n es 0 ó 1; y p está comprendido entre 1 y 4.

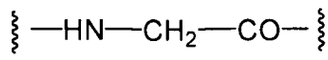
[0562] Otros ejemplos de unidades espaciadoras autoinmolativas incluyen, pero no están limitadas a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), análogos heterocíclicos PAB (patente EE.UU. No. 2005/0256030), beta-glucurónido (documento WO 2007/011968) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que se someten a ciclización tras hidrólisis de la unión amida, como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues y

col., (1995), Chemistry Biology, 2: 223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos adecuadamente (Storm y col., (1972), J. Amer. Chem. Soc., 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., (1990), J. Org. Chem., 55:5867). La eliminación de fármacos con aminas que se sustituyen en la glicina (Kingsbury y col., (1984), J. Med. Chem., 27:1447) también es un ejemplo de espaciadores autoinmoladores útiles en los ADC.

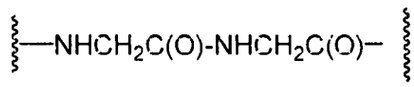
[0563] Las unidades espaciadoras ejemplares (-Y_y-) se representan mediante las Formulas X-XII:



X



XI

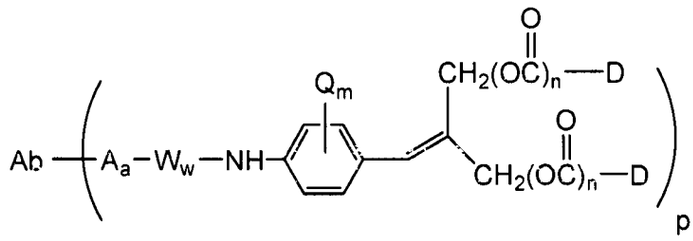


XII

Enlazadores dendríticos

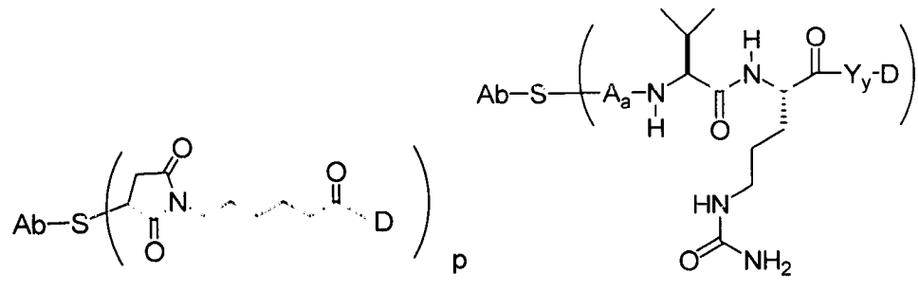
[0564] En otra forma de realización, el enlazador L puede ser un enlazador de tipo dendrítico para el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo a través de una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun y col., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por tanto, cuando un conjugado de anticuerpos con fármacos sólo contiene un grupo reactivo de tioles de cisteína, se pueden unir muchísimas porciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico. Entre las formas de realización ejemplares de enlazadores dendríticos ramificados se puede mencionar 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y unidades de dendrímeros de 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (WO 2004/01993, Szalai y col., (2003), J. Amer. Chem. Soc., 125:15688-15689, Shamis y col., (2004), J. Amer. Chem. Soc., 126:1726-1731 y Amir y col., (2003), Angew. Chem. Int. Ed., 42:4494-4499).

[0565] En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad ramificada de bis(hidroximetil)estireno (BHMS), que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tengan la siguiente estructura:



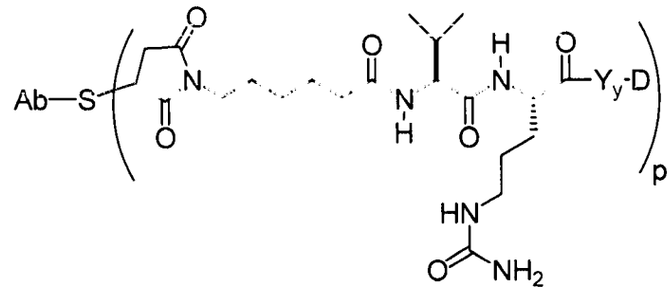
incluyendo una unidad de dendrímero 2-(4-aminobenzilideno)propano-1,3-diol (WO 2004/043493; de Groot y col., (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), en la que Q es $-C_1$-C_8 alquilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero entre 0 a 4; n es 0 ó 1; y p se encuentra entre 1 y 4.

[0566] Formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) y XIIId (MC-val-cit-PAB):

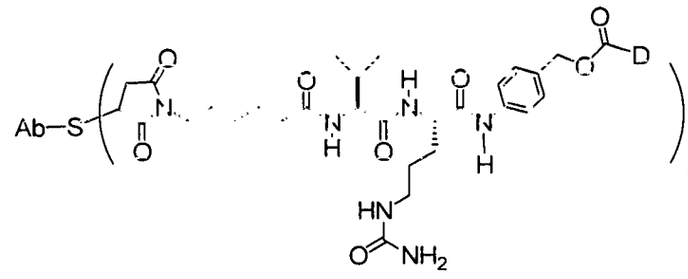


XIIIa

XIIIb



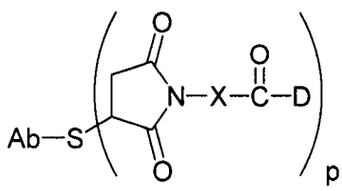
XIIIc



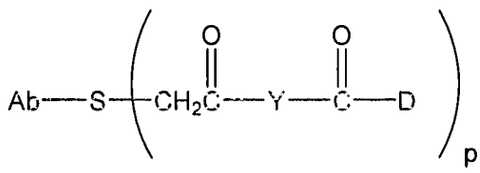
XIIId

[0567] Otras formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula Ia incluyen XIV a-e:

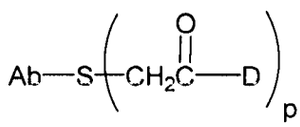
26B



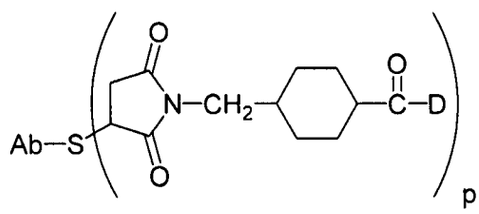
XIVa



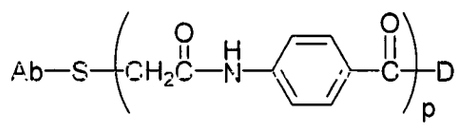
XIVb



XIVc

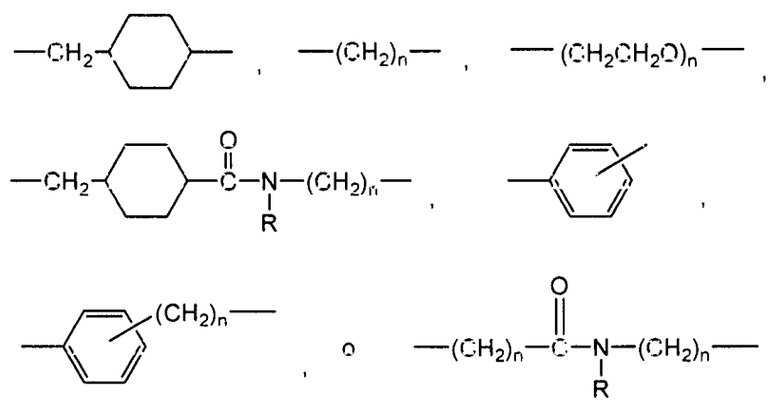


XIVd

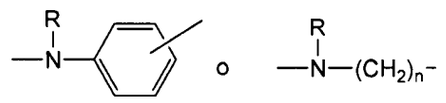


XIVe

donde X es:



Y es:



y R es independientemente H o C_1–C_3 alquilo; y n es 1 a 12.

[0568] En otra forma de realización, un enlazador posee un grupo funcional reactivo que posee un grupo nucleófilo reactivo a un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Algunos de los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, entre otros, los grupos carbonilos de aldehídos y acetonas. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpos. Los grupos nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero no se limitan a, la hidracida, oxima, amina, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con un enlazador.

[0569] Por lo general, los enlazadores tipo péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) "The Peptides", volumen 1, págs. 76-136, Academic Press), que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los enlazadores intermedios pueden ensamblarse con cualquier combinación o secuencia de reacciones incluyendo unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos. Las unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos pueden utilizar grupos funcionales reactivos que sean de naturaleza electrófila, nucleófila o sin radicales. Los grupos funcionales reactivos incluyen, entre otros, los carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y grupos salientes como O-mesil, O-tosil, -Cl, -Br, -I; o maleimida.

[0570] Por ejemplo, un sustituto cargado, como el sulfonato ($-SO_3^-$) o amonio, puede incrementar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de unión del reactivo enlazador con el anticuerpo o la porción de fármaco, o facilitar la reacción de unión de Ab-L (intermediario anticuerpo-enlazador) con D o D-L (intermediario fármaco-enlazador) con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

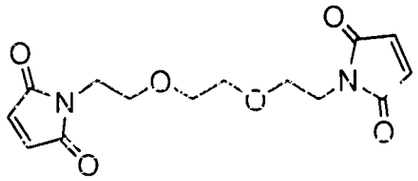
Reactivos enlazadores

[0571] Los conjugados del anticuerpo y la auristatina se pueden realizar utilizando una variedad de reactivos enlazadores bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno).

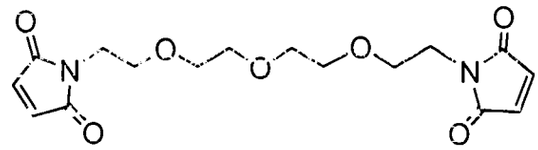
[0572] Los conjugados de anticuerpos con fármacos también pueden prepararse con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME,

290

BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietilenglicol ($BM(PEO)_2$), y 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol ($BM(PEO)_3$), comercializados por Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, y otros proveedores de reactivos. Estos reactivos bis-maleimido permiten la unión de un grupo tiol libre de un residuo de cisteína de un anticuerpo a una porción de fármaco que contiene un tiol, un marcador o un enlazador intermedio, de manera secuencial o simultánea. Otros grupos funcionales además de la maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo diseñado con cisteína, fracción de fármaco, etiqueta o enlazador intermedio incluyen la yodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, bisulfuro, piridil bisulfuro, isocianato e isotiocianato.



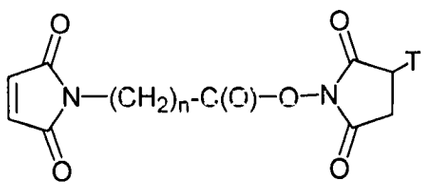
$BM(PEO)_2$



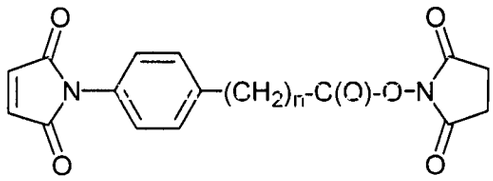
$BM(PEO)_3$

[0573] Los reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tal como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) o se pueden sintetizar según los procedimientos descritos en Toki y col., (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch y col., (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186, la patente de EE.UU. No. 6214345, el documento WO 02/088172; las solicitudes de patentes de EE.UU. 2003130189 y 2003096743 y los documentos WO 03/026577, WO 03/043583 y WO 04/032828.

[0574] Las unidades de extensión de fórmula (IIIa) pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos enlazadores con el extremo terminal N de una unidad de aminoácidos:

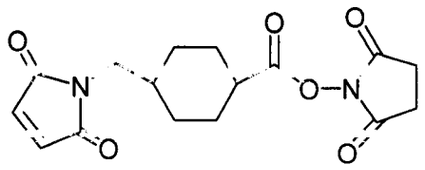


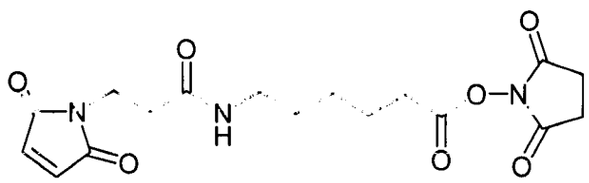
en donde n es un número entero de 1 a 10 y T es -H o $-SO_3Na$;

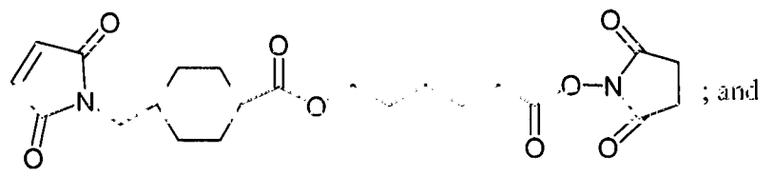


donde n es un número entero con rango entre 0 y 3;

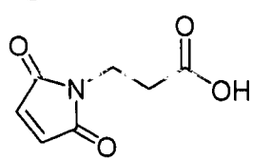
271



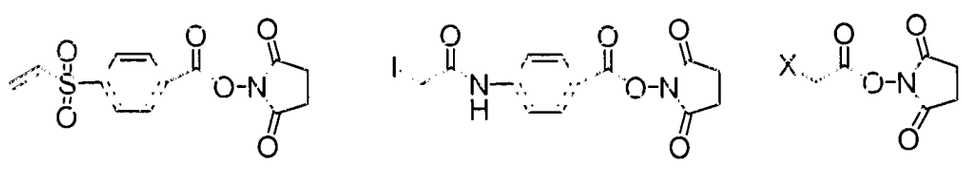


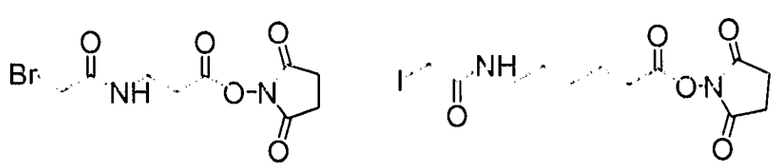


; and



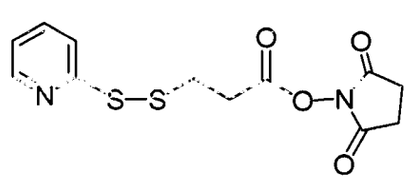
[0575] Las unidades de extensión pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo terminal N de una unidad de aminoácidos:

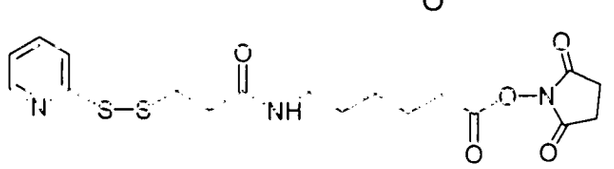




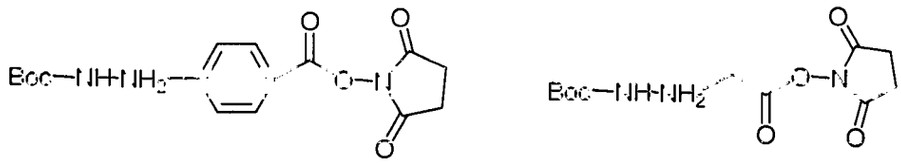
donde X es Br o I.

[0576] Las unidades de extensión pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácidos.

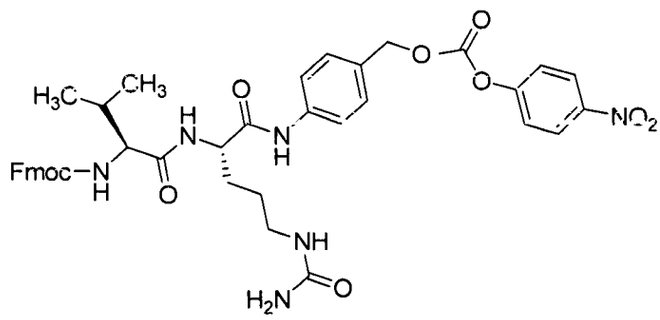




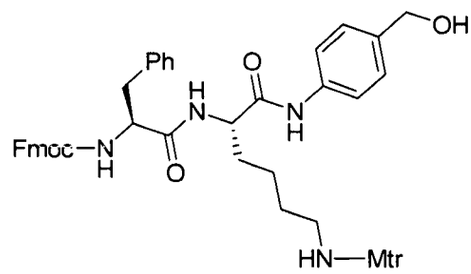
272



[0577] Un reactivo enlazador de dipéptidos valina-citrulina (val-cit o vc) ejemplar que posee una unidad de extención de maleimida y un espaciador autoinmolador para-aminobencilcarbamoil (PAB) posee la siguiente estructura:



[0578] Un reactivo enlazador de dipéptidos phe-lys(Mtr, mono-4-metoxitritil) ejemplar que posee una unidad de extención de maleimida y una unidad espaciadora autoinmoladora PAB puede prepararse según Dubowchik y col. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, y tiene la siguiente estructura:



Preparación de conjugados de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína con fármacos

[0579] Un ADC de la Fórmula I se puede preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, como: (1) una reacción de un grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína con un agente enlazador, para formar un intermediario anticuerpo-enlazador Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una porción del fármaco D activado, y (2) una reacción de un grupo nucleófilo de una porción del fármaco con un reactivo enlazador, para formar un intermediario fármaco-enlazador D-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con el grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína. Los métodos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una variedad de anticuerpos diseñados con cisteína, porciones de fármacos y enlazadores para preparar conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I.

[0580] Los grupos tiol de cisteína del anticuerpo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los reactivos enlazadores y los enlazadores a fármacos intermedios, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluros de ácido, (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas, (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos, y (iv) bisulfuros, incluyendo piridil bisulfuros, mediante un intercambio de sulfuros. Los grupos nucleófilos en una porción del fármaco incluyen, aunque sin limitarse a, los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las porciones enlazadoras y reactivos enlazadores.

[0581] Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden convertirse en reactivos para conjugarse con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitol) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfino; Getz y col., (1999) Anal. Biochem. Vol. 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de reoxidación para reformar los enlaces bisulfuros intercadena e intracadena (Ejemplo 5). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales diseñados con cisteína de longitud completa (ThioMab) expresados en las células CHO se reducen con un exceso molar de TCEP de aproximadamente 50 veces durante 3 horas a 37 °C para reducir los enlaces bisulfuros en los aductos de cisteína, que pueden formarse entre los residuos de cisteína introducidos recientemente y la cisteína presente en el medio de cultivo. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en 10 mM de acetato sódico, pH 5, y se eluye con PBS que contiene 0,3 M de cloruro de sodio. Los enlaces bisulfuros se restablecieron entre los residuos de cisteína presentes en el Mab original con sulfato de cobre ($CuSO_4$) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante toda la noche. Alternativamente, el ácido dehidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos bisulfuros de la intracadena del anticuerpo diseñado con cisteína después de reducir la escisión de aductos de cisteína. Se pueden utilizar otros oxidantes, es decir, agentes oxidantes, y condiciones oxidantes, que son bien conocidos en la materia. La oxidación al aire del ambiente también es eficaz. Este paso de nueva oxidación leve y parcial forma eficazmente bisulfuros intracadena con una alta fidelidad y conserva los grupos tiol de los residuos de cisteína introducidos recientemente. Se agregó y mezcló un exceso de aproximadamente 10 veces del enlazador a fármaco intermedio, como por ejemplo, MC-vc-PAB-MMAE, y se dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para lograr una conjugación y formar el conjugado de anticuerpo anti-CD79b con fármacos. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y eluyó a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso del intermediario fármaco-enlazador y otras impurezas.

[0582] La Figura 16 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo diseñado con cisteína expresado desde el cultivo celular para la conjugación. Cuando el medio de cultivo celular contiene cisteína, los aductos de bisulfuros pueden formarse entre los aminoácidos con cisteína introducidos recientemente y las cisteínas del medio. Estos aductos de cisteínas, que se muestran como un círculo en el ThioMab ejemplar (izquierda) en la Figura 16, deben reducirse para generar anticuerpos reactivos

diseñados con cisteína para la conjugación. Los aductos de cisteínas, supuestamente junto con varios enlaces bisulfuros intercadena, se escinden de manera reductora para obtener una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tal como TCEP. Los enlaces bisulfuros de intercadenas entre residuos de cisteína emparejados se reforman bajo condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o con la exposición al oxígeno del ambiente. Los residuos de cisteína introducidos recientemente, diseñados e independientes permanecen disponibles para la reacción con los reactivos enlazadores o los intermediarios fármaco-enlazador para formar los conjugados de anticuerpos de la invención. Los ThioMab expresados en las líneas celulares de mamíferos dan lugar a conjugados de Cys externamente aducidos a una Cys diseñada mediante una formación de unión –S-S-. Por tanto, los ThioMab purificados se tratan con los procedimientos de reducción y nueva oxidación, tal como se describen en el Ejemplo 5, para producir ThioMab reactivos. Estos ThioMab se utilizan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimidos, fluoróforos y otros marcadores.

10. Inmunoliposomas

[0583] Los anticuerpos anti-CD79b detallados en la presente memoria descriptiva también se formulan como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma están dispuestos formando dos capas, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la materia, como por ejemplo el descrito en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); patentes de los Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se dan a conocer en la patente de los Estados Unidos No. 5.013.556.

[0584] Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo presentes en esta invención se pueden conjugar con los liposomas tal y como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de bisulfuro. Opcionalmente, el liposoma puede contener un agente quimioterapéutico. Ver Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

B. Algunos métodos de elaboración de anticuerpos

1. Tamizaje para encontrar anticuerpos anti-CD79b con las propiedades deseadas

[0585] Las técnicas para generar anticuerpos que se unan a los polipéptidos CD79b han sido descritas anteriormente. Se pueden seleccionar más anticuerpos con ciertas características biológicas, tal como se desee.

[0586] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-CD79b de la invención pueden evaluarse mediante métodos conocidos en la materia; por ejemplo, utilizando células que expresen un polipéptido anti-CD79b ya sea endógenamente o siguiendo la transfección con el gen CD79b. Por ejemplo, las líneas de células tumorales apropiadas y las células transfectadas de CD79b se pueden tratar con un anticuerpo anti-CD79b monoclonal de la invención en diversas concentraciones durante unos cuantos días (por ejemplo, de 2 a 7 días) y se pueden teñir con cristal violeta o MTT o se pueden analizar mediante otro análisis colorimétrico. Otro método de medir la proliferación sería comparando la absorción de ^{3}H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CD79b de la invención. Tras el tratamiento con anticuerpos, las células se recogen y la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de escintilación. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición *in vivo* del crecimiento de células tumorales puede determinarse de diversas formas conocidas en la materia. Preferentemente, la célula tumoral es una que sobreexprese un polipéptido de CD79b. El anticuerpo anti-CD79b inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que exprese CD79b *in vitro* o *in vivo* de aproximadamente 25 a 100% cuando se compara con una célula tumoral no tratada, preferentemente, por aproximadamente 30 a 100%, y aún con mayor preferencia por aproximadamente 50 a 100% o 70 a 100%, en una realización, a una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpos de alrededor de entre 0,5 y 30 µg/ml o entre 0,5 y 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina de 1 a 10 días tras la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es un inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-CD79b, a concentraciones de alrededor de entre 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, da lugar a la reducción del tamaño del tumor o la proliferación celular entre unos 5 días y 3 meses después de la primera administración del anticuerpo, preferentemente entre unos 5 y 30 días.

[0587] Para seleccionar un anticuerpo anti-CD79b que induzca muerte celular, puede evaluarse la pérdida de la integridad de la membrana como se indica, por ejemplo, mediante yoduro de propidio (PI), azul de tripano o absorción de 7AAD con relación al control. Se puede realizar un análisis de absorción de PI en ausencia de células efectoras inmunes y de complemento. Las células tumorales que expresan el polipéptido CD79b se incuban solamente con medio o con un medio que contenga el anticuerpo anti-CD79b apropiado (por ejemplo, a aproximadamente 10µg/ml). Las células se incuban durante 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se alicuotan en tubos de 35 mm con filtro en la tapa de 12 x 75 (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para eliminar la agregación celular. Los tubos

reciben entonces el PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Estos anticuerpos anti-CD79b que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se determina mediante absorción de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-CD79b inductores de muerte celular.

[0588] A fin de examinar los anticuerpos que se unen al epítopo en un polipéptido CD79b unido por un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este análisis se puede utilizar para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo sitio o epítopo como un anticuerpo anti-Cd79b conocido. De forma alternativa, o adicionalmente, el mapeado de epítopos se puede efectuar a través de métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo puede mutarse por barridos de alanina, a fin de identificar los residuos de contacto. Inicialmente se prueba la capacidad de unión del anticuerpo mutante al anticuerpo policlonal para garantizar un plegamiento correcto. En un método diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de un polipéptido CD79b se pueden utilizar en análisis de competición con un anticuerpo de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítopo caracterizado o conocido.

2. Algunos métodos de detección de bibliotecas

[0589] Los anticuerpos anti-CD79b de la invención se pueden obtener utilizando bibliotecas combinatorias para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la materia diversos métodos para generar bibliotecas de representación en imágenes de fagos y detectar dichas bibliotecas para anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se encuentran descritos, generalmente, en Hoogenboom y col., (2001) en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas formas de realización, en Lee y col., (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093.

[0590] En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan examinando bibliotecas de fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable (Fv) de anticuerpos fusionados a una proteína de revestimiento fágico. Estas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad para detectar el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, de este modo, se separan de los clones de la biblioteca que no tienen capacidad de unión. Los clones con capacidad de unión se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento apropiado de detección de antígenos para seleccionar el clon del fago de interés, seguido por la construcción de un clon del anticuerpo anti-CD79b de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) convenientes, descritas en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0591] En determinadas formas de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo está formado a partir de dos regiones variables (V) de unos 110 aminoácidos, una correspondiente a la

232

cadena ligera (VL) y otra correspondiente a la cadena pesada (VH), que presentan en ambos casos tres asas hipervariables (HVR) o regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden representar funcionalmente en el fago, bien como fragmentos de Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL estén covalentemente enlazados por medio de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que estén fucionados a un dominio constante e interactúen no covalentemente, como se describe en Winter y col., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria descriptiva, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

[0592] Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en librerías de fagos, en las que se puede buscar por clones de unión a antígeno, como se describe en Winter y col., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunogen sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una gran variedad de antígenos extraños y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths y col., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Por último, las librerías vírgenes también se pueden producir sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reorganizados procedentes de células madre y utilizando cebadores de la PCR que contengan secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y para conseguir la reorganización in vitro como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[0593] En determinadas formas de realización, el fago filamentoso se utiliza para representar fragmentos de anticuerpos mediante fución a la proteína de revestimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden representar como fragmentos Fv de cadena única, en los que los dominios de VH y VL están conectados a la misma cadena polipepídica mediante un separador de polipéptidos flexible, como se describe en Marks y col, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se segrega en el periplasma del anfitrión celular bacteriano donde el ensamblaje de una estructura proteínica de la cápsida de Fab se representa en la superficie del fago mediante el desplazamiento de las proteínas de la cápsida de tipo natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

[0594] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de inmunocitos recolectados de humanos o animales. Si se desea una biblioteca que presente un sesgo a favor de clones anti-CD79b, el sujeto se inmuniza con CD79b para generar una respuesta de anticuerpos y las células del bazo o los linfocitos B circulantes u otros linfocitos de la circulación periférica (PBL) se recuperan para la construcción de la biblioteca. En una forma de realización preferente, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones de anti-CD79b se obtiene al generar una respuesta a un anticuerpo anti-CD79b en ratones transgénicos

278

portadores de una secuencia de genes humanos funcionales de la inmunoglobulina (y carentes de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógenos), de forma que la inmunización con CD79b da lugar a células B productoras de anticuerpos humanos anti-CD79b. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

[0595] El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a anti-CD79b se puede obtener mediante un procedimiento de detección adecuado para aislar linfocitos B que expresen un anticuerpo unido a membrana específico de CD79b, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad a CD79b o adsorción de células a CD79b marcada con fluorocromo seguida de separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0596] Alternativamente, el uso de células del bazo o linfocitos B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que CD79b no es antigénico. En el caso de bibliotecas que incorporen la construcción de genes de anticuerpos in vitro, las células madre se recolectan del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no organizados. Los inmunocitos de interés se pueden obtener de diversas especies animales, como humanos, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y especies aviares, etc.

[0597] Los segmentos de regiones variables de genes de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo los segmentos VH y VL) se recuperan a partir de las células de interés y se amplifican. En el caso de librerías de genes de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN o el ARNm genómico de los linfocitos, seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplan a los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reorganizados, como se describe en Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), lo que permite obtener diversos repertorios de genes V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir del ADNc y ADN genómico, con cebadores reversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores anversos dentro del segmento J, como se describe en Orlandi y col. (1989) y Ward y col., Nature, 341: 544-546 (1989). 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores reversos también se pueden situar en el exón líder, como se describe en Jones y col., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores anversos dentro de la región constante, como se describe en Sastry y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar la degeneración en los cebadores, como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). En ciertas formas de realización, la diversidad de bibliotecas se maximiza utilizando cebadores de la PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las organizaciones disponibles de VH y VL presentes en la muestra de ácidos nucleicos de inmunocitos, por ejemplo, como se describe en el método de Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum y col., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se

279

pueden introducir sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de la PCR como una señalización en un extremo, según se describe en Orlandi y col. (1989), o mediante una nueva amplificación de la PCR con un cebador señalizado, como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991).

[0598] Se pueden derivar in vitro repertorios de genes V sintéticamente reorganizados a partir de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (según Tomlinson y col. J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeado (explicados en Matsuda y col., Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluidas todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2) se pueden utilizar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de la PCR que codifican bucles de H3 de secuencia y longitud diversas, como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden producir con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una longitud única, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de Vκ y Vλ humanos se han clonado y secuenciado (explicado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para preparar repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gran variedad de dominios de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN codificadores de genes V, los segmentos de genes V de línea germinal se pueden reorganizar in vitro según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[0599] Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos al combinar de varias formas repertorios de genes de VH y VL. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar in vitro, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., Gene, 128: 119-126 (1993), o in vivo mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El procedimiento de la recombinación in vivo se aprovecha de las dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la librería impuesto por la eficacia de transformación de E. coli. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas se combinan a continuación mediante infección fágica de bacterias que contienen fagémidos, de forma que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca sólo está limitado por la cantidad de células presentes (unos 10^{12} clones). Los dos vectores contienen señales de recombinación in vivo, por lo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se introducen en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan una gran cantidad de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

[0600] Alternativamente, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar juntos mediante PCR y, luego, clonarlos, como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de la PCR también se puede utilizar para unir los ADN de VH y VL con un

280

ADN que codifique un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena única (scFv). En otra técnica, "el ensamblaje de la PCR en el interior de la célula" se usa para combinar genes de VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y, luego, clonar repertorios de genes enlazados, como se describe en Embleton y col., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

[0601] Los anticuerpos producidos por bibliotecas vírgenes (sean naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 to 10^7 M^{-1}), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar in vitro construyendo bibliotecas secundarias y volviendo a seleccionar en ellas, como se describe en Winter y col., (1994) citado anteriormente. Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente in vitro utilizando polimerasa con tendencia al error (explicado en Leung y col., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Asimismo, la maduración de la afinidad se puede realizar mutando de forma aleatoria una o más CDR, por ejemplo, mediante PCR con cebadores portadores de secuencias aleatorias que abarquen la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados, y examinando clones de mayor afinidad. En el documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) se describió un método para inducir la mutagénesis en una región de determinación de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulinas para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro método eficaz consiste en recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por representación en fagos con repertorios de variantes de domino V que se producen naturalmente obtenidos a partir de donantes no inmunizados y detectar los de mayor afinidad en varias series de nueva transposición de cadenas, como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades del orden de 10^{-9} M o menos.

[0602] La detección de las bibliotecas se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar CD79b para revestir los pozos de las placas de adsorción, expresado en huéspedes celulares en placas de adsorción o utilizado en separación celular, o conjugado con biotina para captura con partículas revestidas de estreptavidina, o utilizados en cualquier otro procedimiento conocido en la materia para detectar bibliotecas de representación de imágenes de fagos.

[0603] Las muestras de bibliotecas de fagos están en contacto con el CD79b inmovilizado en condiciones aptas para la unión de al menos una porción de partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la concentración iónica, la temperatura y similares, se seleccionan de forma que imiten condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, posteriormente, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competición antigénica con CD79b, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición antigénica de Clackson y col., Nature, 352: 624-

281

628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20 a 1.000 veces en una única serie de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacterianos y someterse a nuevas series de selección.

[0604] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de la disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpos de un único fago se pueden unir simultáneamente a un antígeno. Los anticuerpos con rápida cinética de disociación (y afinidades de unión débiles) se pueden conservar mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de revestimiento del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que, además, favorece de nuevo la unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de largos lavados y representación en fagos monovalentes, como se describe en Bass y col., Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

[0605] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de distintas afinidades, incluso con afinidades que difirieran ligeramente, para CD79b. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como la realizada en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad) es probable que ocasione muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y unos cuantos con afinidad más alta. Con un CD79b limitado, los fagos raros de alta afinidad pudieran ser sacados de la competición. Para conservar todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con una cantidad mayor de CD79b biotinilado, pero con el CD79b biotinilado a una concentración de molaridad menor de la constante de afinidad molar blanco para CD79b. Los fagos con mayor afinidad de unión pueden, entonces, capturarse mediante partículas paramagnéticas revestidas de estreptavidina. Esta "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite aislar clones mutantes con una afinidad tan sólo dos veces mayor de un gran exceso de fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para distinguirlos en función de la cinética de disociación.

[0606] Los clones anti-CD79b se pueden seleccionar en función de la actividad. En ciertas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que se unen a células vivas que expresan naturalmente el CD79b. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD79b que bloquean la unión entre un ligando de CD79b y CD79b, pero no bloquean la unión entre un ligando de CD79b y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a estos anticuerpos anti-CD79b se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-CD79b de una biblioteca de fagos como se ha descrito antes y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fagos mediante el cultivo de la población en un huésped bacteriano apropiado; (2) seleccionando CD79b y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-CD79b a CD79b inmovilizado; (4) usando una mayor cantidad de la segunda proteína para eluir los clones no deseados que reconocen los determinantes de unión a CD79b que se solapan o se

282

comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína y (5) elución de los clones que todavía no se han adsorbido tras el paso (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/ no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer también mediante repetición de los procedimientos de selección descritos en la presente memoria descriptiva una o más veces.

[0607] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridromas o los clones de presentación de fagos Fv de la invención es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleóticos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de plantillas de ADN de fagos o hibridomas). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células anfitrión, como por ejemplo las células de E. coli, las células COS de mono, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, a fin de obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrión recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

[0608] El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena ligera o de la cadena pesada (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener según Kabat y col., como se ha descrito anteriormente) para formar clones que codifiquen cadenas ligeras o pesadas de longitud total o parcial. Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y obtener de cualquier humano o especie animal. Un clon de Fv se deriva del ADN del dominio variable de una especie animal (por ejemplo, un humano) y, luego, se fusiona al ADN de la región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias de codificación, puesto que una cadena ligera y/o pesada de longitud completa e "híbrida" está incluida en la definición de anticuerpo "híbrido" y "quimérico" como se usa en la presente memoria descriptiva. En determinadas formas de realización, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN humano de región constante para formar una o más secuencias de codificación para todas las cadenas ligeras o pesadas humanas de longitud parcial o completa.

[0609] El ADN que codifica un anticuerpo anti-CD79b derivado de un hibridoma también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma por la secuencia de codificación para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humanas (por ejemplo, como en el método de Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado del clon de Fv o un hibridoma se puede modificar a su vez mediante el enlace covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea

783

inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos de la invención derivados del clon de hibridoma o del clon de Fv.

C. Terapia con profármaco con mediación enzimática dependiente de anticuerpos (ADEPT)

[0610] Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en la ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidil, véase el documento WO81/01145) en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. No. 4.975.278.

[0611] El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo pueda convertir en su forma citotóxica más activa.

[0612] Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, entre otras, fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contengan fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contengan fosfato en fármacos libres; deaminasa de citosina, útil ara convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico 5-fluoracilo; proteasas, tales como proteasa serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos, como β-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir fármacos derivados de β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amino de grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la materia como "abzimas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos libres activos (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Los conjugados de anticuerpo y abzima se pueden preparar como se describe en la presente memoria descriptiva para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

[0613] Las enzimas de la presente invención se pueden unir de forma covalente a los anticuerpos anti-CD79b mediante técnicas bien conocidas en la materia, como el uso de los reactivos heterobifuncionales reticulantes mencionados anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que incluyen al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención enlazado al menos a una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature 312: 604-608 (1984)).

D. Anticuerpos anti-CD79b

[0614] Además de los anticuerpos anti-CD79b aquí descritos, se contempla que pueden prepararse variantes de los anticuerpos anti-CD79b. Las variantes de anticuerpos anti-CD79b se pueden

284

preparar introduciendo cambios adecuados en los nucleótidos en el ADN codificador o mediante síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la materia observarán que los cambios en los aminoácidos pueden alterar los procesos postranslacionales del anticuerpo anti-CD79b, por ejemplo, cambiando el número o posición de los sitios de glicosilación o alterando las características de anclaje a la membrana.

[0615] Se pueden introducir variaciones en los anticuerpos anti-CD79b descritos en la presente memoria descriptiva utilizando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservadoras y no conservadoras explicadas, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 5.364.934. Estas variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifiquen el anticuerpo o polipéptido, lo que origina un cambio en la secuencia de aminoácidos con respecto al anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación consiste en la sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido en uno o más dominios del anticuerpo anti-CD79b. Las pautas para determinar qué residuo aminoacídico se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar negativamente la actividad deseada se pueden obtener mediante comparación de la secuencia del anticuerpo anti-CD79b con la de las moléculas proteínicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser la consecuencia de sustituir un aminoácido por otro con propiedades estructurales o químicas similares, como la sustitución de una leucina por una serina; es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o deleciones pueden oscilar, opcionalmente, entre 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y el análisis de las variantes resultantes para evaluar la actividad presentada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

[0616] En la presente memoria descriptiva se presentan los fragmentos de anticuerpo anti-CD79b. Dichos fragmentos pueden truncarse en los terminales N o C, o carecer de residuos internos, por ejemplo, en comparación con una proteína o un anticuerpo nativo de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-CD79b.

[0617] Los fragmentos del anticuerpo anti-CD79b se pueden preparar mediante diversas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo supone generar fragmentos de anticuerpos o polipéptidos mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima que se sepa que escinde las proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos, o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada entraña el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifique un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la PCR, en los extremos 5' y 3' de los cebadores, se emplean oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ADN. Preferentemente,

los fragmentos de anticuerpo anti-CD79b comparten al menos una actividad biológica o una actividad inmunológica con el anticuerpo anti-CD79b nativo presentado en la presente memoria descriptiva.

[0618] En realizaciones concretas, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 6, bajo el epígrafe de sustituciones preferentes. Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces se producen cambios más sustanciales y se examinan los productos. Estas sustituciones se denominan sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe más adelante, en referencia a las clases de aminoácidos.

Tabla 6

Residuo Original	Substituciones Ejemplares	Substituciones Preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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
Lis (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Fe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Tr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tir (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala, norleucina	leu

[0619] Las modificaciones sustanciales en la homología inmunológica o funcional del anticuerpo anti-CD79b se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el punto de objetivo, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que aparecen naturalmente se dividen en grupos basándose en sus propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) acídicos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0620] Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservadora o, preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

[0621] Las variaciones se pueden realizar utilizando métodos conocidos en la materia, como mutagénesis (dirigida al sitio) con mediación de oligonucleótidos, barrido de alanina y mutagénesis dirigida mediante PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis por inserción de un casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis de selección restringida [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas que pueden ser realizadas en el ADN clonado para producir la variante de ADN del anticuerpo anti-CD79b.

[0622] También se puede emplear el análisis de aminoácidos por barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos preferentes obtenidos por barrido están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Estos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. Generalmente, en este grupo, la alanina es un aminoácido preferente obtenido por barrido, porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-beta y tiene menos probabilidades de alterar la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina se suele preferir también porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones expuestas como ocultas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no permite obtener cantidades suficientes de la variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

[0623] Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo anti-CD79b también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar reticulaciones atípicas. Al contrario, la(s) unión(es) de cisteína se pueden agregar al anticuerpo anti-CD79b para mejorar su estabilidad (particularmente en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como por ejemplo un fragmento Fv).

[0624] Una clase de variante de sustitución particularmente preferente supone sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para profundizar en su desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental desde el cual se generó (generaron). Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución involucra la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Las variantes del anticuerpo generadas de este modo se presentan de forma monovalente, a partir de partículas de fagos filamentosos, como fusiones con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes representadas en imágenes de fagos se examinan entonces para detectar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), tal como se revela en la presente memoria descriptiva.

287

Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis mediante barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido CD79b. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas estas variantes, el panel de variantes se somete a examen, como se describe en la presente memoria descriptiva, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para desarrollo posterior.

[0625] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD79b se preparan a través de diversos métodos conocidos en la materia. Éstos incluyen, aunque sin limitarse a, el aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que aparezcan naturalmente) o la preparación por mutagénesis con mediación de oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis dirigida mediante PCR y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-CD79b.

E. Modificaciones de los anticuerpos anti-CD79b

[0626] Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-CD79b se incluyen en el ámbito de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos objetivo de un anticuerpo anti-CD79b con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos terminal N o C del anticuerpo anti-CD79b. La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para la reticulación del anticuerpo anti-CD79b con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su empleo en el método para la purificación de anticuerpos anti-CD79b, y viceversa. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, p.ej., 1,1-bis(diazoacetilo)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres de ácido 4-azido-salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres de disuccinimidilo como 3,3'-ditiobis(succinimidolpropionato), maleimidos bifuncionales como bis-*N*-maleimido-1,8-octano y agentes como metilo-3-[(p-azidofenilo)ditio]propioimidato.

[0627] Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo por los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilos de residuos seriles o treoniloc, metilación de los grupos α-amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación del terminal N amino y amidación de cualquier grupo carboxilo terminal C.

[0628] Otra clase de modificación covalente del anticuerpo anti-CD79b incluida en el campo de la presente invención consiste en alterar el patrón nativo de glicosilación del anticuerpo o polipéptido. Para los fines de la presente memoria descriptiva, la "alteración del patrón nativo de glicosilación" significa la eliminación de una o más porciones de carbohidratos presentes en la secuencia nativa del anticuerpo anti-

288

CD79b (ya sea eliminando el sitio de glicosilación subyacente, o suprimiendo la glicosilación en sí mediante medios químicos o enzimáticos) o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del anticuerpo anti-CD79b. Además, esta frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, lo que entraña un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos residuos de carbohidratos presentes.

[0629] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos se realiza, generalmente, por enlace N u O. El enlace N se refiere al anclaje del residuo glucídico en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0630] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-CD79b se logra cómodamente al alterar la secuencia del aminoácido para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos por enlace tipo N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo anti-CD79b original (para sitios de glicosilación por enlace O). Opcionalmente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD79b se puede alterar introduciendo cambios en el ADN, especialmente mutando el ADN que codifique el anticuerpo anti-CD79b en bases previamente seleccionadas, de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0631] Otro medio de aumentar la cantidad de residuos glucídicos en el anticuerpo anti-CD79b es mediante emparejamiento químico o enzimático de los glicósidos al polipéptido. Estos métodos se describen en la materia, por ejemplo, en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

[0632] La eliminación de los residuos glucídicos presentes en el anticuerpo anti-CD79b se puede lograr por métodos químicos o enzimáticos o por sustitución mutacional de los codones que codifican a los residuos aminoacídicos que sirven como objetivos para la glicosilación. Las técnicas químicas de desglicosilación son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, y col., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y Edge y col., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de residuos de carbohidratos en polipéptidos puede llevarse a cabo mediante el uso de diversas endo- y exo-glicosidasas, tal como se describe en Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

[0633] Otro tipo de modificación covalente de un anticuerpo anti-CD79b comprende la unión del anticuerpo a uno de diversos polímeros no proteináceos, como por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, tal como se establece en las patentes de EE.UU. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también puede

289

atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

[0634] El anticuerpo anti-CD79b de la presente invención también se puede modificar de manera que forme moléculas quiméricas que comprendan un anticuerpo anti-CD79b fusionado con otro polipéptido heterólogo o una secuencia de aminoácidos.

[0635] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-CD79b con un polipéptido señalizador que suministra un epítopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antiseñal. El señalizador del epítopo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-CD79b. La presencia de dichas formas de epítopos marcador del anticuerpo anti-CD79b puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcado. Asimismo, gracias a la señal del epítopo el anticuerpo anti-CD79b puede purificarse fácilmente mediante purificación de afinidad usando un anticuerpo antiseñal o cualquier otra clase de matriz de afinidad que se una a la señal del epítopo. Varios polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la materia. Los ejemplos incluyen a los marcadores de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly), el marcador polipeptídico HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-mic y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y el marcador de la glicoproteína D del virus de herpes simplex (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen al péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; al péptido epítopo KT3 [Martin y col., Science, 255:192-194 (1992)]; a un péptido epítopo de α-tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y al marcador proteico peptídico 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

[0636] En una forma de realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-CD79b con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (a la que también se hace referencia como una "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-CD79b por al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una forma de realización preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH_2 y CH_3, o la bisagra, CH_1, CH_2 y las regiones CH_3 de una molécula de IgG1. Para la producción de las fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE.UU. No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

F. Preparación de los anticuerpos anti-CD79b

[0637] La siguiente descripción está relacionada principalmente con la producción de anticuerpos anti-CD79b mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b. Como es de suponer, se tiene en cuenta que se pueden emplear métodos alternativos, bien conocidos en el sector, para preparar anticuerpos anti-CD79b. Por ejemplo, se puede producir la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. Se puede realizar la síntesis de proteínas *in vitro* utilizando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente diversas porciones del anticuerpo anti-CD79b por separado y combinadas utilizando métodos químicos o enzimáticos a fin de producir el anticuerpo anti-CD79b deseado.

1. Aislamiento del ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b

[0638] Se puede obtener ADN que codifica los anticuerpos anti-CD79b de una biblioteca de ADNc preparada con tejido que se estima que posea el ARNm del anticuerpo anti-CD79b y que lo exprese a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-CD79b humano se pueden obtener fácilmente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante los procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada del ácido nucleico).

[0639] Las bibliotecas se pueden explorar con sondas (como oligonucleótidos de al menos unas 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína que éste codifica. La exploración del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo utilizando procedimientos estándar, como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Otro medio de aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-CD79b consiste en usar técnicas de PCR [Sambrook y col., citado anteriormente; Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0640] Las técnicas de exploración de una biblioteca de ADNc son bien conocidas en la materia. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían tener la longitud suficiente y ser lo suficientemente inequívocas como para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN de la librería que se esté explorando. Los métodos de marcado son bien conocidos en la materia e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P, biotinilación o marcado enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo las restrictivas moderadas y altas, se indican en Sambrook y col., citado anteriormente.

[0641] Las secuencias identificadas en estos métodos de exploración de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas como GenBank u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de las secuencias (ya sea al

291

nivel de aminoácidos o nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o en la secuencia de longitud completa se puede determinar mediante métodos conocidos en la materia, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0642] El ácido nucleico con secuencia codificadora de proteínas se puede obtener mediante exploración de moléculas de ADNc o bibliotecas genómicas seleccionadas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida detallada en la presente memoria descriptiva por primera vez y, si fuera necesario, empleando métodos convencionales de extensión de cebadores tal como se describe en Sambrook y col., citado anteriormente, para detectar precursores e intermediarios del procesamiento del ARNm que tal vez no se hayan retrotranscrito en ADNc.

2. Selección y transformación de las células huésped

[0643] Las células huésped se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en la presente memoria descriptiva para la producción de aminoácido anti-CD79b y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados adecuadamente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Un experto en la materia puede seleccionar sin experimentación indebida las condiciones de cultivo, como el medio de cultivo, la temperatura, el pH y similares. En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., citado anteriormente.

[0644] Los métodos de transfección de células eucarióticas y de transformación de células procarióticas, que significan introducción de ADN al huésped para que el ADN sea replicable, sea como un integrante extracromosómico o cromosómico, son conocidos para el experto en la materia, como por ejemplo, $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediada por liposomas, polietileno-glicol/DMSO y electroporación. Según la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, descrito en Sambrook y col., citado anteriormente, o electroporación, se utiliza generalmente para las procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin estas paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de mamíferos en la patente de EE.UU. No. 4.399.216. Las transformaciones en levadura se suelen llevar a cabo según el método de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). No obstante, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para información sobre diversas técnicas para la transformación de células

292

de mamíferos, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

[0645]Las células huésped adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores.

a. Células huésped procarióticas

[0646] Entre las procariotas aptas se encuentran, aunque no exclusivamente, las arqueobacterias y eubacterias, los como microorganismos positivos o gram negativos, por ejemplo, enterobacteriáceas, como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* se encuentran disponibles al público, como las cepas *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huéspedes procarióticas apropiadas incluyen a las Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, asimismo, *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P detalladas en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* y *Streptomyces*. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. La cepa W3110 es una huésped particularmente preferente o parental, porque comúnmente actúa como huésped en las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula anfitrión secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; ATCC No. de depósito 27.325) puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, siendo ejemplos de dichos huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que posee el genotipo completo *tonA* ; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que posee el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que posee el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r}; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que posee el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación por deleción *degP* no resistente a la kanamicina; *E. coli W3110* cepa 33D3 con genotipo W3110 Δ*fhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan*^{R} (patente de EE.UU. No. 5.639.635) y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa mutante periplásmica detallada en la patente de Estados Unidos No. 4.946.783 otorgada el 7 de agosto de 1990. Otras cepas y derivados de estas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli*$_\lambda$ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308(ATCC 31.608) también son apropiadas. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. Los métodos para construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en el sector y se describen, por ejemplo, en Bass *y col.*, Proteins, 8:309-314 (1990). Por lo general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, Serratia o Salmonella se pueden usar como huésped cuando se utilizan plácmidos bien conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar al replicón. Normalmente, en caso de que la célula huésped deba secretar cantidades mínimas de enzimas

293

proteolíticas puede resultar conveniente incorporar al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa. Alternativamente, son adecuados los métodos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos.

[0647] Los anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión del anticuerpo se pueden producir en bacterias, en especial cuando la glicosilación y la función efectora de Fc no se necesitan, lo que ocurre por ejemplo cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en E. coli es más rápida y rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.648.237 (Carter y col.), 5.789.199 (Joly y col.), y 5.840.523 (Simmons y col.), que describen las secuencias de señal y la región de iniciación de la traducción (TIR) para optimizar la expresión y secreción. Estas patentes se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Tras la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta celular de E. coli en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteínas A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse de forma similar al proceso de purificación de anticuerpos expresados en, por ejemplo, células CHO.

b. Células huésped eucarióticas

[0648] Además de procariotas, los microbios eucariotas como los hongos filamentosos o la levadura también son aptos como huéspedes para expresión o clonación de los vectores de codificación del anticuerpo anti-CD79b. Un microorganismo de eucariotas inferiores comúnmente utilizado como huésped es *Saccharomyces cerevisiae*. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus; yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrichna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente memoria descriptiva e incluyen, entre otras, levaduras susceptibles de crecimiento en metanol seleccionadas en el género formado por *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis,* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son

294

ejemplos típicos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

[0649] Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-CD79b glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados están las células de insectos como Drosofila S2 y Espodoptera Sf9, así como células vegetales, como cultivos celulares de algodón, maíz, patatas, semilla de soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped permisivas de insectos procedentes de huéspedes como*Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles diversas cepas de virus para transfección, por ejemplo, la variante L-1 del NPV *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV *Bombyx mori* y estos virus se pueden usar como el virus en la presente memoria descriptiva, de conformidad con la presente invención, en concreto para la transfección de las células de *Spodoptera frugiperda*.

[0650] No obstante, el mayor interés se ha centrado en las células de vertebrados, y la propagación de éstas en cultivos (histocultivo) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); las células de riñón de bebé de hámster (BHK, ATCC CCL 10); las células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); las células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0651] Las células anfitrión se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-CD79b y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

[0652] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico (ADNc o ADN genómico) que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. Se aísla el ADN que codifica el anticuerpo y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula anfitrión que se

utilice. Por lo general, las células huésped preferidas son de origen procariótico o eucariótico (en general, de mamíferos).

[0653] El vector, por ejemplo, puede presentarse en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia apropiada de ácidos nucleicos se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector suelen incluir, aunque sin limitarse a, una o más secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción. En la construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes se emplean técnicas estándar de ligado que los expertos en la materia conocen.

[0654] El CD79b puede producirse de forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido con un sitio de escisión específico en el extremo terminal N de la proteína madura o el polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-CD79b que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de la levadura, el líder del factor alfa (incluidos los líderes del factor-α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la Patente de EE.UU. No. 5.010.182), o el líder de la fosfatasa acídica, el líder de la glucoamilasa *C. albicans* (Patente Europea 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646, publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias de señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, como secuencias de señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma especia o de una especie afín, así como líderes secretores virales.

a. Células huésped procarióticas

[0655] Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes de polipéptidos del anticuerpo de la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias deseadas de polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar a partir de anticuerpos que producen células, como por ejemplo células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en los anfitriones procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden utilizar para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y la célula anfitrión concreta que se transformará con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo o ambas) y su compatibilidad con la célula huésped concreta en la que resida.

[0656] En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. Ambos, los vectores de expresión y de clonación, contienen una secuencia de ácido nucleico que permiten al vector su replicación en una o más células seleccionadas del huésped, así como marcando secuencias que son capaces de brindar selección fenotípica en las células transformadas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322, que contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y a la tetraciclina (Tet) y, por lo tanto, brindan un medio fácil para identificar células transformadas, es factible para la mayoría de las bacterias gram negativas, el origen 2μ plásmido es viable para levaduras y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) y son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresar proteínas endógenas. Ejemplos de derivados del pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter y col., Patente de EE.UU. No. 5.648.237.

[0657] Además, los vectores fágicos que contienen secuencias de control y replicón compatibles con los microorganismos anfitrión se pueden usar como vectores de transformación con relación a estos anfitriones. Por ejemplo, un bacteriófago como λGEM.TM.-11 se puede utilizar para producir un vector recombinante que se pueda utilizar para transformar células anfitrión susceptibles como *E. coli* LE392.

[0658] El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotores de cistrón, que codifiquen cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada antes de su extremo 5' en un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos suelen pertenecer a dos clases: inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es aquél que inicia un aumento de los niveles de transcripción del cistrón bajo su control como respuesta a cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

[0659] Se conocen un gran número de promotores reconocidos por diversas células huésped posibles. El promotor seleccionado puede enlazarse funcionalmente al ADN del cistrón que codifica la cadena pesada o ligera mediante eliminación del promotor del ADN fuente a través de digestión enzimática mediante restricción e inserción de la secuencia aislada del promotor en el vector de la invención. Tanto la secuencia nativa del promotor como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes objetivo. En algunas formas de realización, se utilizan promotores heterólogos, puesto que por lo general permiten una mayor transcripción y producción del gen objetivo expresado, en comparación con el promotor polipeptídico objetivo nativo.

[0660] Los promotores reconocidos por diversas células huésped posibles son bien conocidos. Los promotores disponibles para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, el sistema promotor de β-galactamasa y lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res.,

297

8:4057 (1980); EP 36.776] y promotores híbridos tales como el *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] o el promotor *trc*. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente enlazada al ADN que codifica al anticuerpo anti-CD79b. Sin embargo, también son aptos otros promotores que son funcionales en bacterias (como otros promotores fágicos o bacterianos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, lo que permite que un experto pueda ligarlas de manera operable a cistrones que codifiquen las cadenas pesada y ligera blanco (Siebenlist y col. (1980) Cell 20:269) usando enlazadores o adaptadores que proporcionen los sitios de restricción necesarios.

[0661] En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados en una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector o una parte del ADN del polipéptido objetivo que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para los propósitos de esta invención debería ser aquélla que la célula anfitrión reconozca y procese (es decir, que una peptidasa de señal escinda). En las células anfitrión procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre el grupo formado por fosfatasa alcalina, penicilasa, Ipp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias de señal usadas en los dos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de ellas.

[0662]En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula anfitrión y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se expresan, multiplican y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas de huéspedes (por ejemplo, las cepas de *E. coli trxB*$^-$) ofrecen condiciones citoplasmáticas que son favorables a la formación de uniones de bisulfuro, lo que permite una multiplicación y ensamblaje correctos de las subunidades de las proteínas expresadas. Proba y Pluckthun, *Gene*, 159:203 (1995).

[0663] Los anticuerpos de la invención también se pueden producir usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados se pueda modular para maximizar la producción de anticuerpos secretados y debidamente ensamblados de la invención. Esta modulación se logra al menos en parte mediante modulación simultánea de concentraciones translacionales para los componentes polipeptídicos.

[0664] Una técnica para la modulación de la concentración translacional se divulga en Simmons y col., Patente de EE.UU. No. 5.840.523. Utiliza variantes de la región de iniciación translacional (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos con un intervalo de concentraciones translacionales, lo que proporciona un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las

variantes de la TIF se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan lugar a cambios en codones que pueden alterar la secuencia aminoacídica, a pesar de que cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos son preferentes. Las alteraciones en la TIF pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es generar un "banco de codones" al inicio de una secuencia de codificación que no cambie la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir cambiando la posición del tercer nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, como leucina, serina y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden añadir complejidad para realizar el banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura y col., (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

[0665]Preferentemente, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de concentraciones de TIF para cada cistrón en ellos. Este conjunto limitado permite una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como la producción de los productos deseados de anticuerpos en varias combinaciones de concentraciones de TIF. Las concentraciones TIF se pueden determinar cuantificando el nivel de expreción de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons y col., patente de EE.UU. N.º 5.840.523. En función de la comparación de las concentraciones translacionales, las TIF individuales se seleccionan para su combinación en los constructos del vector de expreción de la invención.

b. Células huésped eucarióticas

[0666] Los componentes del vector suelen incluir, entre otros, uno o más de los siguientes elementos: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción.

(1) Componente de secuencia de la señal

[0667] Un vector para uso en una célula huésped eucariótica puede también contener una secuencia de señal u otro polipéptido con una escisión específica en el término N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que la célula huésped reconoce y procesa (*es decir*, escindida por una peptidasa de señal). En la expresión celular de los mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD.

[0668] El ADN para esa región precursora está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen de la replicación

[0669] Por lo general, un componente origen de la replicación no es preciso para los vectores de expresión en mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

(3) Gen componente de selección

[0670] Los vectores de expresión y clonación contendrán, por lo general, un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes básicos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa alanina D para *Bacilli*.

[0671] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que otorga resistencia al fármaco y, así, sobreviven al régimen de selección. En ejemplos de esta selección dominante se utilizan fármacos como neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0672] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD79b, como DHFR o timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, *etc.* Una célula huésped apropiada cuando se emplea el DHFR de tipo natural es la línea celular de CHO deficientes en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096), preparada y propagada como se describe en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Alternativamente, las células huésped (en especial los huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, *p. ej.*, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de EE.UU. No. 4.965.199.

[0673] Un gen de selección apto para su uso en levadura es el gen *trp*1 presente en el plásmido de levadura YEp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp*1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

(4) Componente promotor

[0674] Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor enlazado operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-CD79b para dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por diversas células huésped posibles son bien conocidos.

[0675] Los genes prácticamente aleucarióticos tienen una región rica en AT situada aproximadamente a entre 25 y 30 bases, antes del sitio donde se inicie la trascripción. Otra secuencia que se encuentra a entre 70 y 80 bases, antes del extremo 5' del promotor, del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT, en que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para añadir la cola de poli(A) al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan bien en los vectores de expresión eucariótica.

[0676] Entre los ejemplos de secuencias de promotores adecuados para el uso con huéspedes de levadura están los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato dechidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[0677] Otros promotores de la levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de tener una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotores para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato dechidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En la patente europea No. 73.657 se describen con mayor detalle los vectores y promotores adecuados para usarlos en la expresión de la levadura.

[0678] La transcripción del anticuerpo anti-CD79b a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el virus polioma, el virus de la viruela de las aves de corral (patente del R.U. No. 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), el adenovirus (como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus del simio 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

[0679] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978. Véase

también Reyes *y col.*, *Nature* 297:598-601 (1982) para la expresión del ADNc del interferón beta humano en células de ratón bajo control de un promotor timidina quinasa a partir del virus del herpes simplex. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(5) Componente del elemento potenciador

[0680] La trascripción del ADN que codifica el polipéptido del anticuerpo anti-CD79b mediante eucariotas superiores se puede aumentar, con frecuencia, al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, que, por lo general, oscilan entre 10 y 300 bp y que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente, se conocen diversas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Algunos ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) acerca de los elementos de potenciación para activar los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' a la secuencia de codificación del anticuerpo anti-CD79b pero está situado preferiblemente en un sitio a 5' desde el promotor.

(6) Componente de finalización de la transcripción

[0681] Los vectores de expreción utilizados en células huésped eucarióticas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la trancripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5' y, ocasionalmente, el 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica al anticuerpo anti-CD79b. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

[0682] Otros métodos, vectores y células huésped aptas para adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-CD79b en cultivos de células recombinantes de vertebrados se describen en Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); Patente Europea 117.060; y Patente Europea 117.058.

4. Cultivo de las células huésped

[0683] Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-CD79b de esta invención se pueden cultivar en diversos medios.

a. Células huésped procarióticas

[0684] Las células procarióticas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la materia y aptos para el cultivo de células huésped seleccionadas. Un

302

ejemplo de medio apropiado es el caldo de Luria (LB) más nutrientes suplementarios necesarios. En algunas formas de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en función de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procarióticas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios de cultivo para el crecimiento de células que expresen un gen resistente a ampicilina.

[0685] Otros suplementos necesarios aparte de carbono, nitrógeno y fuentes inorgánicas de fosfato también se pueden incluir a concentraciones apropiadas introducidas solas en una mezcla con otro suplemento o medio de cultivo como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados en el grupo formado por glutationa, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

[0686] Las células anfitrionas procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. El crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, se produce a un rango de temperaturas comprendido entre unos 20 °C a unos 39 °C; mejor aún, entre unos 25 °C a unos 37 °C; y, aún mejor, a unos 30 °C. El pH del medio de cultivo puede ser cualquiera comprendido entre 5 y 9 aproximadamente, dependiendo sobre todo del microorganismo huésped. En el caso de *E. coli*, el pH oscila preferentemente entre 6,8 y 7,4, y más preferentemente alrededor de 7,0.

[0687] Si un promotor inducible se utiliza en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones aptas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Según esto, las células anfitrión transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para conseguir la inducción. Preferiblemente, el medio de cultivo limitador de fosfato es el C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons y col., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden utilizar otros inductores, según el constructo de vector empleado, como se sabe en el sector.

[0688] En una forma de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células anfitrión y de allí se recuperan. La recuperación de las proteínas supone habitualmente la alteración del microorganismo, por lo general mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez producida la alteración de las células, los desechos celulares o células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse aún más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con resina. De manera alternativa, se pueden transportar proteínas dentro del medio de cultivo y aislarlas en él. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para proceder a una posterior purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden volver a aislarse e identificarse mediante métodos comúnmente conocidos, como la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y los ensayos "Western blot".

[0689] En uno aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Existen varios procesos disponibles de fermentación de lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala

se realizan en dispositivos de al menos 1.000 litros de capacidad, preferentemente entre 1.000 y 100.000. Estos fermentadores utilizan agitadores de hélice para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala hace referencia generalmente a la fermentación en fermentadores de aproximadamente no más de 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de 1 a 100 litros aproximadamente.

[0690] En un proceso de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia típicamente después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta alcanzar la densidad deseada, por ejemplo una OD_{550} de entre 180-220, momento en el cual las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse distintos inductores, de acuerdo con el constructo del vector utilizado, tal como se conoce en la materia y se ha descrito anteriormente. Las células pueden hacerse crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante unas 12-50 horas, aunque es posible utilizar tiempos de inducción más cortos o más prolongados.

[0691] Se pueden modificar distintas condiciones de fermentación para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuados de los polipéptidos de los anticuerpos secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresen las proteínas chaperonas, como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilpropil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para transformar conjuntamente las células anfitrión procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan la solubilidad y el plegamiento adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células bacterianas huésped. Chen y col., (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie y col. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

[0692] Para la presente invención, se pueden utilizar ciertas cepas huésped con deficiencia de enzimas proteolíticas para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas (especialmente las que son sensibles desde el punto de vista proteolítico). Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas relativas a los genes que codifican proteasas bacteriales conocidas, como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas de *E. coli* con deficiencia de proteasas están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly y col. (1998), *citado anteriormente*, las patentes de EE.UU. nos 5.264.365 y 5.508.192 (Georgiou y col.) y Hara y col., *Microbial Drug Resistance*, , 2:63-72 (1996).

[0693] En una forma de realización, en el sistema de expresión de la invención se utilizan como células huésped cepas de *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

b. Células huésped eucarióticas

[0694] Medios comercializados como el F10 de Ham (Sigma), el Medio esencial mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y el Medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma)

con aptos para el cultivo de células anfitrión. Además, cualquiera de los medios de cultivo descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem.102:255 (1980), patentes de EE.UU. No. 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Ref. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo habitual en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Otros suplementos necesarios se pueden incluir también a concentraciones adecuadas que serán conocidas por aquellos con conocimientos en la materia. Las condiciones del cultivo, como temperatura o pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán conocidas por los expertos en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

[0695] La amplificación y/o expresión génica se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante Southern blot convencional, Northern blot para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (análisis del ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda debidamente marcada, basada en las secuencias suministradas en la presente memoria descriptiva. Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, ARN, híbridos de ADN-ARN o ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos se pueden marcar y se puede llevar a cabo el análisis donde el dúplex está unido a una superficie, de forma que, tras la formación del dúplex en la superficie, se pueda detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

[0696] Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante métodos inmunológicos, como tinción inmunohistoquímica de células o secciones ticulares y análisis de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expreción del producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o análisis de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar en cualquier mamífero. Es útil que los anticuerpos se puedan preparar contra una secuencia nativa de polipéptido CD79b o contra un péptido sintético sobre la base de las secuencias de ADN proporcionadas en la presente memoria descriptiva, o contra una secuencia exógena fusionada con el ADN de CD79b y que codifique un epítopo específico del anticuerpo.

6. Purificación de los anticuerpos anti-CD79b

[0697] Las formas del anticuerpo anti-CD79b pueden recuperarse de un medio de cultivo o de licados de células huésped. Si se encuentra unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-CD79b pueden sufrir una alteración por diversos

3pg

medios físicos o químicos, tales como ciclo de congelación/descongelación, sonicación, alteración mecánica o agentes de lisado celular.

[0698] Es posible que se desee purificar el anticuerpo anti-CD79b para separarlo de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos tienen un carácter ejemplar en lo que se refiere a los procedimientos de purificación adecuados: mediante el fraccionamiento en una columna de intercambio iónica; precipitación de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice o en resina de intercambio catiónico como DEAE, cromatoisoenfoque; SDS-PAGE; precipitación de sulfato de amonio; usar filtración en gel, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes como IgG; y columnas de quelantes metálicos para unir las formas marcadas con epítopo del anticuerpo anti-CD79b. Pueden utilizarse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). Las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del anticuerpo anti-CD79b particular producido.

[0699] Al utilizar técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente, en el espacio periplasmático, o se puede secretar directamente en el medio de cultivo. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primer paso, los desechos de partículas, ya sean células anfitrión o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para el aislamiento de anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Puede resumirse diciendo que la pasta celular se funde en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) en unos 30 minutos. Los residuos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero, por lo general, utilizando un filtro para concentración de proteínas comercializado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las fases anteriores se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF para inhibir la proteólisis y antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes espontáneos.

[0700] La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo esta última la técnica preferida de purificación. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas γ1, γ2 o γ4 humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la γ3 humana (Guss y col., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a que el ligando de afinidad se une es, sobre todo, agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina

Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, dependiendo del anticuerpo que quiera recuperarse, otras técnicas para purificar proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

[0701] Siguiendo cualquiera de los pasos preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden estar sujetos a cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando una solución tamponada de elución a un pH entre 2,5 y 4,5 aproximadamente, preferiblemente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, sal entre 0-0,25 M.

G. Formulaciones farmacéuticas

[0702] Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada según la afección que deba tratarse. Por lo general, los ADC se administrarán parenteralmente, es decir, por infusión, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal o epidural.

[0703] Para el tratamiento de estos cánceres, en una forma de realización, el conjugado de anticuerpo con fármacos se administra por infusión intravenosa. La dosis que se administra por infusión varía aproximadamente entre 1 $\mu g/m^2$ y 10.000 $\mu g/m^2$ por dosis, por lo general, una dosis semanal de un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el rango de dosificación va de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 1000 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 800 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 600 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 400 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 500 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 300 $\mu g/m^2$, de aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 200 $\mu g/m^2$, y de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 200 $\mu g/m^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez por semana; una vez al mes o intermitentemente para aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos descritos hasta la remisión del tumor o hasta que los síntomas del linfoma, leucemia estén siendo tratados. La administración puede continuar después de lograr la remisión o el alivio de los síntomas, siempre que dicha remisión o alivio se mantengan debido a la administración continua.

[0704] La invención también proporciona un método para aliviar una enfermedad autoinmune, que comprende la administración al paciente con la enfermedad autoinmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de anticuerpo 2F2 humanizado con fármacos de cualquiera de las formas de realización precedentes. En las formas de realización preferentes, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea. El conjugado con el anticuerpo y el fármaco se administra por vía intravenosa en una dosis entre el rango de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 100 mg/ m^2 por dosis y

307

en la forma de realización preferente, la dosis va de 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 500 $\mu g/m^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez por semana; una vez al mes o intermitentemente para aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente hasta lograr el alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmune que se trata. La administración puede continuar después de lograr el alivio de los síntomas, siempre que dicho alivio se mantenga debido a la administración continua.

[0705] La invención también proporciona un método de tratamiento de un trastorno de las células B que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado 2F2 de cualquiera de las formas de realización precedente a un paciente que padece un trastorno de células B, tal como un trastorno proliferativo de células B (incluyendo, entre otros, el linfoma y la leucemia) o una enfermedad autoinmune, dicho anticuerpo no está conjugado con una molécula citotóxica ni con una molécula detectable. El anticuerpo se administrará típicamente en un rango de dosis de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ hasta aproximadamente 1000 mg/m^2.

[0706] En un aspecto, la invención además proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-CD79b de la invención, al menos un inmunoconjugado de éste o al menos un conjugado de anticuerpo anti-CD79b con fármacos de la invención. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica incluye (1) un anticuerpo de la invención o un inmunoconjugado del mismo y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende (1) un anticuerpo de la invención o un inmunoconjugado de éste, o ambos, y opcionalmente (2) al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan, a los descritos a continuación. Por lo general, los ADC se administrarán parenteralmente, es decir, por infusión, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

[0707] Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo anti-CD79b o el inmunoconjugado CD79b utilizado de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un antagonista o anticuerpo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Ocol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros

carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; tonificantes, como trehalosa y cloruro sódico; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; surfactantes como polisorbato; contraiones que formen sales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas para administración *in vivo* deben ser, por lo general, estériles. Esto se logra mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0708] Las formulaciones de la presente memoria descriptiva también contienen más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquéllas con actividades complementarias que no se afecten de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-CD79b, podría ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-CD79b que se una a un epítopo distinto en el polipéptido CD79b, o un anticuerpo para algún otro objetivo como un factor del crecimiento que afecte al crecimiento del cáncer en cuestión. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

[0709] Los ingredientes activos también se pueden conservar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de presentación de medicamentos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980).

[0710] Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), polilácticos (patente de EE.UU. No. 3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros del ácido glicólico-ácido láctico degradables como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímeros del ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etilenvinilo y el ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas por un período de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo menores. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo por un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, lo que ocasiona una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible concebir estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se observa que el mecanismo de agregación es

de formación de uniones intermoleculares S-S mediante el intercambio tio-bisulfuro, se puede lograr la estabilización mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, liofilizando soluciones ácidas, controlando la humedad, utilizando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

[0711] Un anticuerpo puede formularse de cualquier forma apropiada para su administración a un tejido/célula blanco. Por ejemplo, los anticuerpos pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma están dispuestos formando dos capas, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la materia, como por ejemplo el descrito en Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); patentes de los Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se revelan en la patente de los Estados Unidos Nº 5.013.556.

[0712] Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo presentes en esta invención se pueden conjugar con los liposomas tal y como se describe en Martin y col. *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de bisulfuro. Opcionalmente, el liposoma puede contener un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon y col., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

[0713] Las formulaciones para utilizar en administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

H. Tratamiento con anticuerpos anti-CD79b

[0714] Existen varias pruebas de detección para determinar la expresión de CD79b en el cáncer. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido CD79b puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido de una biopsia tumoral embebidas en parafina pueden ser sometidas a prueba IHC y evaluarse según el siguiente criterio de intensidad de tinción proteínica de CD79b:

Puntuación 0: no se observa tinción alguna, o se observa tinción de la membrana en menos del 10% de las células tumorales.

Puntuación 1+: se detecta una tinción leve/apenas apreciable en más del 10% de las células tumorales. Sólo una parte de la membrana de las células presenta tinción.

Puntuación 2+: se detecta una tinción entre débil y moderada en toda la membrana de más del 10% de las células tumorales.

310

Puntuación 3+: se detecta una tinción entre moderada y fuerte en toda la membrana de más del 10% de las células tumorales.

[0715] Aquellos tumores con puntuación 0 ó 1+ en la expresión del polipéptido de CD79b pueden caracterizarse como tumores que no sobreexpresan CD79b, mientras que los que tengan una puntuación 2+ ó 3+ pueden caracterizarse como tumores que sobreexpresan CD79b.

[0716] De forma alternativa, o adicionalmente, las pruebas FISH como INFORM® (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) pueden realizarse en tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina para determinar la extención (si la hay) de la sobreexpresión de CD79b en el tumor.

[0717] La sobreexpresión o amplificación de CD79b puede evaluarse utilizando una prueba diagnóstica *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (como un anticuerpo) que une la molécula que se quiera detectar y está señalizada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o marcador fluorescente) y explorando externamente al paciente para localizar el marcador.

[0718] Como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-CD79b de la invención tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-CD79b de la presente invención pueden ser útiles para determinar el avance de los cánceres que expresan el polipéptido CD79b (como por ejemplo, en radioimágenes). Los anticuerpos también son útiles para purificar o inmunoprecipitar los polipéptidos de CD79b de las células, detectar y cuantificar los polipéptidos de CD79b *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o un Western blot, y matar y eliminar las células de una población heterogénea que expresen CD79b como paso en la purificación de otras células.

[0719] Actualmente, según la fase del cáncer, el tratamiento contra el cáncer implica uno o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-CD79b puede ser especialmente deseable en pacientes de mayor edad que no toleren bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en casos de enfermedad metastácica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-CD79b de la invención que actúan sobre un tumor objetivo son útiles para aliviar los cánceres que expresen CD79b tras el diagnóctico inicial de la enfermedad o durante las recidivas. Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-CD79b se puede utilizar solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogenes o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-CD79b puede administrarse junto con otras formas de terapias convencionales, bien antes, simultáneamente o después de una de estas terapias convencionales. Los fármacos quimioterapéuticos, como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona, se utilizan para tratar el cáncer, en particular, en pacientes con un buen nivel de riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, se puede administrar al paciente anti-CD79b junto con un tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriormente mencionados. En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, por ejemplo, EP0600517). El anticuerpo anti-CD79b se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente

quimioterapéutico. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-CD79b o la molécula pequeña se administra junto con quimioterapia a fin de potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. Las dosis detalladas en la Referencia de Escritorio de los Médicos (PDR, por sus siglas en inglés) de estos agentes se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres. La pauta posológica de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer en particular que deba tratarse, el grado de la enfermedad y otros factores conocidos por los médicos expertos en la materia, y el médico puede determinar dicho régimen.

[0720] En una realización particular, un conjugado formado por un anticuerpo anti-CD79b con un agente citotóxico se administra al paciente. Preferentemente, la célula internaliza el inmunoconjugado unido a la proteína CD79b, ocasionando una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar la célula cancerosa a la cual se une. En una forma de realización preferente, el agente citotóxico actúa o interfiere en el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos, que incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

[0721] Los anticuerpos anti-CD79b o los conjugados de toxinas de los mismos se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo, o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

[0722] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-CD79b. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente exista un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, este tratamiento combinado desencadena un efecto terapéutico sinérgico.

[0723] También puede ser deseable combinar la administración de los anticuerpos anti-CD79b, con la de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado al cáncer en cuestión.

[0724] En otro forma de realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención involucran la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-CD79b y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos u otros agentes citotóxicos o terapéuticos que también inhiban el crecimiento tumoral. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Los calendarios de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente el médico cualificado. Los calendarios de preparación y dosificación para esta quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992). El anticuerpo puede combinarse con un compuesto

312

antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrogénico como tamoxifeno, un antiprogesterona como onapristona (patente europea 616 812) o un antiandrógeno como flutamida, en dosis conocidas para esas moléculas. Si el cáncer que hay que tratar no depende de hormonas, puede que se haya sometido previamente al paciente a un tratamiento antihormonal y, después de que el cáncer se convierta en no dependiente de hormonas, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-CD79b (y opcionalmente otros agentes descritos en la presente memoria descriptiva).

[0725] En ocasiones, puede ser beneficiosa también la coadministración al paciente de un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada al tratamiento) o una o más citocinas. Además de los regímenes terapéuticos descritos anteriormente, el paciente también puede ser sujeto de remoción quirúrgica de las células cancerosas o radioterapia (por ejemplo, radiación externa o terapia con un agente radioactivo marcado, tal como un anticuerpo) antes, concurrentemente o después de la terapia con anticuerpos. Las dosis adecuadas para cualquiera de los anteriores agentes coadministrados son aquéllas que se utilizan actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-CD79b.

[0726] La composición del anticuerpo de la invención debe formularse, dosificarse y administrarse de una manera consistente empleando una práctica médica adecuada. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno específico que se trate, el mamífero específico sometido a tratamiento, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta posológica y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario que el anticuerpo se formule con uno o más de los agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque opcionalmente puede ser así. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores ya abordados con anterioridad. Generalmente, se usan en las mismas dosis y por las mismas vías de administración descritas en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre el 1 y el 99% de las dosis empleadas hasta este momento.

[0727] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, el médico elegirá la dosificación y el modo de administración de acuerdo con criterios conocidos. La pauta posológica dependerá de la clase, gravedad y evolución de la enfermedad que deba tratarse, con independencia de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de las terapias anteriores, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al anticuerpo y del criterio del médico que se ocupe del caso. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Preferiblemente, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyecciones subcutáneas. Según la clase y gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para administrarla a un paciente es de aproximadamente entre 1 µg/kg y 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,1 a 15 mg/kg/dosis) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o una infusión continua. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis de carga inicial de unos 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-CD79b. No obstante, otros

regímenes de dosificación también pueden ser útiles. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que ocurriese una supresión deseada de los síntomas de la misma. El progreso de esta terapia puede supervisarse fácilmente mediante métodos y ensayos convencionales basados en criterios que el médico u otras personas expertas en la materia conocen.

[0728] Además de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Esta administración del ácido nucleico que codifica el anticuerpo queda englobada en la expresión "administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo". Consultar, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 con respecto al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

[0729] Existen dos enfoques principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, generalmente en el lugar en donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existen diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a una célula en cultivo *in vitro*, o *in vivo* en el huésped deseado. Las técnicas adecuadas para transferir *in vitro* el ácido nucleico a células de mamíferos incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato cálcico, etc. Un vector comúnmente utilizado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

[0730] Las técnicas actualmente preferidas para la transferencia de ácido nucleico *in vivo* incluyen la transfección con vectores virales (como por ejemplo un adenovirus, el virus de la Herpes simplex I o un adenovirus asociado) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Col, por ejemplo). Para revisar los protocolos actualmente conocidos de la marcación de genes y la terapia génica, véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Consultar también el documento WO 93/25673 y la referencia citada en el mismo.

[0731] Los anticuerpos anti-CD79b de la invención pueden tener las distintas formas englobadas en la definición de "anticuerpo" de la presente memoria descriptiva. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos o aminoácidos con secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fución, una secuencia del anticuerpo se fuciona con una secuencia de un polipéptido heterólogo. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc a fin de proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se comenta con más detalle en las secciones de la presente memoria descriptiva, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido

a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), reclutando complementos en la citotoxicidad dependiente de complementos o algún otro mecanismo. Alternativamente, cuando se desee eliminar o reducir la función efectora, y a fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, se pueden utilizar ciertas otras regiones Fc.

[0732] En una realización, el anticuerpo compite para unirse, o se une de forma sustancial, al mismo epítopo que el de los anticuerpos de la invención. También se contemplan los anticuerpos que tengan las características biológicas de los anticuerpos anti-CD79b presentes de la invención, incluyendo específicamente la acción *in vivo* sobre un tumor y cualquier inhibición de la proliferación celular o característica citotóxica.

[0733] Los métodos para producir los anteriores anticuerpos se describen con detalle en la presente memoria descriptiva.

[0734] Los actuales anticuerpos anti-CD79b son útiles para el tratamiento de un cáncer que exprese CD79b o para aliviar uno o más síntomas del cáncer en mamíferos. Este cáncer incluye, pero no se limita a, cánceres hematopoyéticos o relacionados con la sangre, como linfoma, leucemia, mieloma o malignidades linfoideas, cánceres del bazo y de los ganglios linfáticos. Otros ejemplos particulares de tales cánceres asociados a células B incluyen, por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de células B tales como, por ejemplo, linfoma de células B asociado al tejido linfático de las mucosas y linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin y linfoma de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (CD5 + linfocitos B), leucemia mieloide, tal como la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda y mielodisplasia) y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B y células T. Las neoplasias malignas engloban los cánceres metastásicos de cualquiera de las clases mencionadas. El anticuerpo es capaz de unirse al menos a una porción de las células cancerosas que expresen un polipéptido de CD79b en el mamífero. En una forma de realización preferente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña es efectivo para destruir o matar las células tumorales que expresen CD79b o inhibir su crecimiento, *in vitro* o *in vivo*, después de unirse a un polipéptido de CD79b en la célula. Entre estos anticuerpos se incluyen los anticuerpos anti-CD79b desnudos (que no se conjugan con ningún agente). El rendimiento de los anticuerpos desnudos con propiedades citotóxicas o inhibitorias del crecimiento celular puede potenciarse aún más con la intervención de un agente citotóxico que les confiera mayor potencia para la destrucción de las células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden conferirse a un anticuerpo anti-CD79b, por ejemplo, conjugándolo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe en la presente memoria descriptiva. El agente citotóxico o inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Las toxinas como la caliqueamicina o un maitansinoide y sus análogos o derivados son preferibles.

[0735] Esta invención ofrece una composición que incluye un anticuerpo anti-CD79b de la invención y un portador. A fin de tratar el cáncer, las composiciones pueden administrarse al paciente que lo necesite, comprendiendo uno o más anticuerpos anti-CD79b presentes, como un inmunoconjugado o el anticuerpo desnudo. En otra realización, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos en combinación con otros agentes terapéuticos como los citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo los quimioterapéuticos. Esta invención ofrece una composición que incluye un anticuerpo anti-CD79b de la invención y un portador. En otra realización, la formulación es una formulación terapéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0736] Otro aspecto de la invención son los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-CD79b. En este grupo se engloban los ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L, y especialmente los residuos de la región hipervariable, las cadenas que codifiquen el anticuerpo con secuencia nativa así como las variantes, modificaciones y versiones humanizadas del mismo.

[0737] La invención también ofrece métodos útiles para tratar un cáncer que exprese un polipéptido de CD79b o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, incluyendo la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD79b, un oligopéptido o una molécula pequeña al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas pueden administrarse a corto plazo (modo agudo), o de forma crónica o intermitente, tal como indique el médico. También se proporcionan métodos para la inhibición del crecimiento y eliminación de células que expresen un polipéptido de CD79b.

[0738] La invención también proporciona kits y artículos de fabricación que incluyen por lo menos un anticuerpo anti-CD79b. Los kits que contienen anticuerpos anti-CD79b se pueden utilizar, por ejemplo, para ensayos de eliminación de células CD79b, para purificación o inmunoprecipitación de polipéptidos CD79b de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación del CD79b, el conjunto puede contener un anticuerpo anti-CD79b, un oligopéptido o una molécula pequeña emparejado con microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Los kits se pueden proporcionar con los anticuerpos para detección y cuantificación del CD79b *in vitro*, por ejemplo en un análisis ELISA o Western blot. Dicho anticuerpo, útil para detección, puede ser proporcionado con un marcador, como por ejemplo, fluorescencia o radiomarcador.

I. Tratamientos de conjugados de anticuerpos con fármacos

[0739] Se contempla que el conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la presente invención puede utilizarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, como por ejemplo, aquellos caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Las afecciones o trastornos hiperproliferativos ejemplares incluyen tumores benignos y malignos, leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteteles, estromales, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo los autoinmunes.

[0740] Los componentes del ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos con células pueden evaluarse en estudios clínicos de humanos y primates mayores con tumores. Se pueden

diseñar estudios clínicos con humanos para evaluar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-CD79b o el inmunoconjugado de la invención en pacientes con trastornos proliferativos de células B, incluyendo, entre otros, el linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. El estudio clínico se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinación con regímenes terapéuticos conocidos, tales como la radiación o la quimioterapia, o ambas, que implican agentes quimioterapéuticos o citotóxicos conocidos.

[0741] Por lo general, la enfermedad o el trastorno que debe tratarse es una enfermedad hiperproliferativa, como por ejemplo, un trastorno proliferativo o un cáncer de células B, o ambos. En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de cáncer que se tratarán incluyen, entre otros, trastornos proliferativos de células B que se seleccionan a partir del linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0742] El cáncer puede comprender células que expresan CD79b para que los ADC de la presente invención sean capaces de unirse a las células cancerosas. Existen diversos ensayos diagnósticos/pronósticos para determinar la expresión de CD79b en el cáncer. En una forma de realización, la sobreexpresión de CD79b puede analizarse mediante un ensayo inmunohistoquímico (IHC). Las secciones de tejido de una biopsia tumoral embebidas en parafina pueden someterse a un ensayo IHC y evaluarse según el criterio de intensidad de tinción proteínica de CD79b con respecto al grado de tinción y la proporción de las células tumorales examinadas.

[0743] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del ADC dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, tal como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. La molécula se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 a 20 mg/kg) de la molécula, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis ejemplar de ADC que se administrará al paciente varía entre 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg del peso del paciente.

[0744] Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de la pauta posológica es la administración de una dosis inicial de carga de aproximadamente

347

4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-ErbB2. Otras pautas posológicas pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

J. Terapia combinada

[0745] Un conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la invención puede combinarse en una formulación farmacéutica combinada o una pauta posológica como una terapia combinada, con un segundo componente con propiedades antineoplásicas. El segundo compuesto de la formulación farmacéutica combinada o la pauta posológica tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación para que no se afecten de manera adversa entre sí.

[0746] El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal o un cardioprotector, o todos los anteriores. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende. Una composición farmacéutica que contiene un ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor que forma tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa o un aglutinante a ADN.

[0747] En un aspecto, el primer compuesto es un ADC anti-CD79b de la invención y el segundo compuesto es un anticuerpo anti-CD20 (ya sea un anticuerpo desnudo o un ADC). En una forma de realización del segundo compuesto es el anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®) o 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Otros anticuerpos útiles para inmunoterapia combinada con los ADC anti-CD79b de la invención incluyen, entre otros, los anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

[0748] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente antineoplásico identificado según esta invención, incluyendo, entre otros, la radioterapia, transplantes de médula ósea o sangre periférica; o un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorrubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

[0749] La terapia combinada puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de manera secuencial, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente exista un período en el cuál ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas.

[0750] En una forma de realización, el tratamiento con un ADC supone la administración combinada de un agente antineoplásico identificado en la presente memoria descriptiva y uno o más

318

agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluida la coadministración de un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes quimioterapéuticos están los taxanos (como paclitaxel y docetaxel) o antibióticos a base de antraciclina, o ambos. La preparación y las programaciones de las dosis de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como lo determine empíricamente el médico cualificado. La preparación y las programaciones de las dosis de dicha quimioterapia también se describen en "Chemotherapy Service", (1992) editor, M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, Md.

[0751] Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados antes mencionados son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente identificado recientemente y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

[0752] La terapia combinada puede proporcionar "sinergias" y ser "sinérgica", es decir, el efecto que se logra cuando los ingredientes activos utilizados en conjunto es mayor a la suma de los efectos que se obtienen del uso de los componentes por separado. Se puede obtener un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos: (1) se formulan conjuntamente y administran simultáneamente en una formulación combinada de dosis unitaria, (2) se administran de manera alternada o paralela como formulaciones separadas, o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran en una terapia alterna, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alterna, se administra una dosis eficaz de cada ingrediente activo de manera secuencial, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, las dosis eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

K. Artículos de fabricación y kits

[0753] Otra forma de realización de la invención es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención o diagnóstico del cáncer que expresa CD79b. El elemento de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, botes, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es efectiva en el tratamiento, prevención o diagnóstico de la afección cancerosa y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón que una aguja hipodérmica pueda perforar). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-CD79b de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición sirve para el tratamiento del cáncer. Además, la etiqueta o prospecto comprende instrucciones para la administración de la composición del anticuerpo al paciente. Adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender un segundo envase que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0754] También se proporcionan kits útiles para diversos propósitos, por ejemplo, ensayos de eliminación de células que expresen CD79b o la purificación o inmunoprecipitación de un polipéptido CD79b de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación del CD79b, el conjunto puede contener un anticuerpo anti-CD79b, un oligopéptido o una molécula pequeña emparejado con microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Los kits se pueden proporcionar con los anticuerpos para detección y cuantificación del polipéptido de CD79b *in vitro*, por ejemplo en un análisis ELISA o Western blot. Como ocurre con el artículo fabricado, el conjunto comprende un envase y una etiqueta o un prospecto en el mismo envase o asociado a él. El envase tiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-CD79b de la invención. Se pueden incluir otros envases adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes, amortiguadores y anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso previsto, ya sea in vitro o diagnóstico.

L. Usos de los polipéptidos CD79b

[0755] La presente invención abarca métodos de exploración de compuestos para identificar aquellos que imiten el polipéptido de CD79b (agonistas) o que impidan los efectos del polipéptido de CD79b (antagonistas). Los ensayos de exploración para los candidatos fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos CD79b codificados por los genes identificados en la presente memoria descriptiva, o interfieren de cualquier otro modo en la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, por ejemplo, inhibiendo la expresión del polipéptido CD79b en las células. Dichos ensayos de detección incluirán ensayos capaces de establecer una detección de alto rendimiento de bibliotecas de productos químicos, con lo cual serán particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña.

[0756] Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de detección bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la materia.

[0757] Todos los ensayos sobre antagonistas son comunes en el sentido de que pretenden poner en contacto al candidato de fármaco con un polipéptido CD79b codificado por un ácido nucleico identificado en la presente memoria descriptiva bajo condiciones, y durante un tiempo suficiente, que permitan a estos dos compuestos interactuar.

[0758] En ensayos de unión, la interacción consiste en la unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de la reacción. En una realización en particular, el polipéptido de CD79b codificado por el gen identificado en la presente memoria descriptiva o el candidato de fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. Por lo general, la unión no covalente se logra revistiendo la superficie sólida con una solución del polipéptido CD79b y dejarla secar. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido CD79b que se quiera inmovilizar, puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se efectúa añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie revestida que

contiene el componente anclado. Cuando la reacción ha terminado, los componentes que no han reaccionado se eliminan, por ejemplo, mediante un lavado, y los complejos anclados en la superficie sólida se detectan. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se formó el complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta un marcador detectable, la formación de complejos puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se una de forma específica al complejo inmovilizado.

[0759] Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido de CD79b particular codificado por un gen identificado en la presente memoria descriptiva, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse a través de métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, como, por ejemplo, reticulación, coinmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden supervisar empleando un sistema genético basado en la levadura descrito por Fields y sus colaboradores (Fields y Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)) tal como detallan Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, como la levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio que se une al ADN y el otro funcionando como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de la levadura descrito en las anteriores publicaciones (al cual se hace habitualmente referencia como el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en que la proteína diana se fusiona con el dominio de la GAL4 que se une al ADN y otra en que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador de GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por la GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de la GAL4 a través de una interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para β-galactosidasa. Clontech comercializa un conjunto completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos. Este sistema también puede ampliarse para mapear dominios de proteínas que intervengan en interacciones de proteínas específicas, así como señalar residuos de aminoácidos que sean cruciales para dichas interacciones.

[0760] Los compuestos que interfieren en la interacción de un gen que codifique un polipéptido CD79b identificado en la presente memoria descriptiva y con otros componentes intra o extracelulares, pueden probarse de la siguiente manera: normalmente, se prepara una mezcla de reacción que contenga el producto del gen y el componente intra o extracelular bajo condiciones, y durante un tiempo suficiente, que permita la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un candidato compuesto para inhibir la unión, la reacción se lleva a cabo en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción que sirva como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente

en la mezcla se supervisa tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva. La formación de un complejo en la(s) reacción(es) de control pero no en la mezcla de reacción que contenga el compuesto de prueba indica que éste interfiere en su interacción con su asociado de reacción.

[0761] Al ensayar en busca de antagonistas, el polipéptido CD79b se puede añadir a una célula junto con el compuesto del cual se quiera examinar una actividad en particular; y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido CD79b indica que dicho compuesto es un antagonista de éste. Alternativamente, los antagonistas pueden detectarse combinando el polipéptido CD79b y un antagonista potencial con receptores de polipéptidos de CD79b unidos a la membrana o receptores recombinantes en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. El polipéptido CD79b puede marcarse, por ejemplo mediante radioactividad, de modo que la cantidad de moléculas de polipéptidos CD79b unidas al receptor se puede usar para determinar la eficacia del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor se puede identificar a través de numerosos métodos que los expertos en la materia conocen, por ejemplo, la selección de ligandos y la clasificación de FACS. Coligan y col., Current Protocols in Immun., 1(2): capítulo 5 (1991). Preferentemente, se emplea la clonación de expresión donde el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula que responda al polipéptido CD79b y se crea una biblioteca de ADNc a partir de este ARN dividida en grupos y utilizada para transfectar células COS u otras células que no respondan al polipéptido CD79b. Las células transfectadas que se han desarrollado en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido CD79b marcado. El polipéptido CD79b puede marcarse a través de diversos medios, incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para el sitio en cuestión. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican, y los subgrupos se preparan y se vuelven a transfectar usando un proceso interactivo de subagrupamiento y de nueva detección, lo cual da lugar finalmente a un clon único que codifica el receptor putativo.

[0762] Como enfoque alternativo para identificar receptores, el polipéptido CD79b marcado puede enlazarse por fotoafinidad a la membrana celular, o se pueden extraer preparaciones que expresen la molécula receptora. El material con enlaces cruzados se resuelve mediante PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede eliminarse, resolverse en fragmentos de péptidos y someterse a un proceso de microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un grupo de sondas de oligonucleótidos degenerados para examinar una biblioteca de ADNc a fin de identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0763] En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresen el receptor se incubarían con el polipéptido CD79b marcado en presencia del compuesto candidato. En consecuencia, podría medirse la capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción.

[0764] Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se una a las fusiones de inmunoglobulina con un polipéptido CD79b y, en particular, anticuerpos, incluyendo,

sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido CD79b que reconozca al receptor pero que no tenga efecto alguno, inhibiendo, por tanto, de forma competitiva la acción del polipéptido CD79b.

[0765] Los anticuerpos que se unen de forma específica a un polipéptido CD79b identificados en la presente memoria descriptiva, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de exploración detallados anteriormente en la presente memoria descriptiva, pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo cáncer, en la forma de composiciones farmacéuticas.

[0766] Si el polipéptido CD79b es intracelular y se utilizan anticuerpos enteros como inhibidores, son preferentes los anticuerpos internalizadores. No obstante, las lipofecciones o liposomas se pueden utilizar también para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilicen fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une de forma específica al dominio de unión de la proteína diana es preferente. Por ejemplo, tomando como referencia las secuencias de la región variable de un anticuerpo, las moléculas peptídicas pueden diseñarse para retener la capacidad de unión de la secuencia de la proteína objetivo. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante la tecnología de ADN recombinante. Véase, *por ej.*, Marasco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

[0767] La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquéllas con actividades complementarias que no se afecten de manera adversa entre sí. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencie su función, como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

M. Derivados de anticuerpos

[0768] Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en el sector y que se encuentran disponibles. Preferentemente, las porciones adecuadas para la derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímero de etilenglicol / propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, óxido de polipropileno / copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la

323

elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y estar ramificado o no. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad o el tipo de polímeros utilizados para la derivatización pueden determinarse en función de ciertas consideraciones, que incluyen, pero no se limitan a las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el anticuerpo derivatizado será utilizado en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

N. Métodos de exploración

[0769] Otra realización de la presente invención se centra en un método para determinar la presencia de un polipéptido CD79b en una muestra de la cual se sospeche que lo contenga. Este método consiste en exponer la muestra a un anticuerpo conjugado con un fármaco que se una al polipéptido CD79b y determinar la unión en el anticuerpo conjugado con un fármaco al polipéptido CD79b en la muestra, considerando que la presencia de esta unión indicaría la presencia del polipéptido CD79b en la misma. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que podrían ser cancerosas) de las cuales se sospeche que expresen el polipéptido CD79b. El anticuerpo conjugado con el fármaco empleado en el método puede, opcionalmente, marcarse de una forma detectable, unida a un soporte sólido, o similar.

[0770] Otra realización de la presente invención se centra en un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero. Este método consiste en (a) poner en contacto una muestra de prueba que contiene células ticulares obtenidas del mamífero con un anticuerpo conjugado con un fármaco, que se une a un polipéptido CD79b y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo conjugado con un fármaco y el polipéptido CD79b en la muestra de prueba, considerando que la formación de dicho complejo indicaría la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo se marca de forma detectable, se une a un soporte sólido, etc. o la muestra de prueba de las células del tejido se obtiene de un individuo del que se sospecha que tiene un tumor canceroso.

IV. Otros métodos de utilización de anticuerpos anti-CD79b e inmunoconjugados

A. Métodos diagnósticos y métodos de detección

[0771] En un aspecto, los anticuerpos anti-CD79b y los inmunoconjugados de la invención son útiles para detectar la presencia de CD79b en una muestra biológica. Por "detectar" se entiende en la presente memoria descriptiva una detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o un tejido. En ciertas formas de realización, estos tejidos incluyen tejidos normales o cancerosos, o ambos, que expresan CD79b a niveles más altos que en otros tejidos, por ejemplo, células B o tejidos asociados a las células B, o ambos.

[0772] En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de CD79b en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende establecer un contacto de la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD79b en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b.

[0773] En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD79b. En ciertas formas de realización, el método supone poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-CD79b; determinar el nivel de expresión (bien cuantitativa o cualitativamente) de CD79b por la célula de prueba mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b; y comparar el nivel de expresión de CD79b por la célula de prueba con el nivel de expresión de CD79b por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen ticular que la célula de prueba o una célula que exprese CD79b a niveles similares a dicha célula normal), donde un nivel más alto de expresión de CD79b de la célula de prueba con respecto a la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD79b. En ciertas formas de realización, la célula de prueba se obtiene a partir de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD79b. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno de proliferación celular, como un cáncer o un tumor.

[0774] Los trastornos proliferativos celulares ejemplares que pueden diagnosticarse mediante un anticuerpo de la invención incluyen un trastorno de células B o un trastorno proliferativo de células B, o ambos, incluyendo, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0775] En ciertas formas de realización, un método de diagnóstico o detección, como los descritos anteriormente, comprende la detección de la unión de un anticuerpo anti-CD79b a CD79b expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que exprese CD79b en su superficie. En ciertas formas de realización, el método comprende establecer un contacto con una célula con un anticuerpo anti-CD79b en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b en la superficie celular. Un ensayo ejemplar para detectar la unión de un anticuerpo anti-CD79b a CD79b expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

[0776] Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CD79b a CD79b. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la materia, como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos inmunohistoquímicos (IHC).

[0777] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD79b están marcados. Las marcas incluyen marcas o fracciones que se detectan directamente (como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminescentes y radioactivas), así como fracciones, como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Ejemplos de estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H y ^{131}I,

fluoróforos como algunos quelantes térreos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferon, luciferasas (por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de EE.UU. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HPP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lizozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HPP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores rotatorios, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

[0778] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD79b están inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización supone separar el anticuerpo anti-CD79b de cualquier CD79b que permanezca libre en solución. Tradicionalmente, esto se consigue bien insolubilizando el anticuerpo anti-CD79b antes del procedimiento de ensayo, o bien mediante adsorción en una superficie o matriz insoluble al agua (Bennich y col., patente de EE.UU. No. 3.720.760), o bien mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o bien mediante insolubilización del anticuerpo anti-CD79b después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

[0779] Cualquiera de las formas de realización anteriores para diagnóstico o detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo anti-CD79b o en adición a él.

B. Métodos terapéuticos

[0780] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se pueden usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos in vitro, ex vivo e in vivo. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación celular bien in vivo o in vitro y dicho método comprende la exposición de una célula a un anticuerpo anti-CD79b o a un inmunoconjugado del mismo en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a CD79b. "Inhibir el crecimiento o la proliferación celular" supone reducir el crecimiento o la proliferación de una célula en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% e incluye inducir la muerte celular. En ciertas formas de realización, la célula es una célula tumoral. En ciertas formas de realización, la célula es una célula B. En ciertas formas de realización, la célula es un xenotrasplante, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria descriptiva.

[0781] En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se usa para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células B. En ciertas formas de realización, el trastorno de proliferación celular se asocia a un aumento de la expresión o actividad, o ambas, de CD79b. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B se asocia a un aumento de la expresión de CD79b en la superficie de una célula B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un tumor o cáncer. Los ejemplos de trastornos proliferativos de células B que

se tratan mediante anticuerpos o inmunoconjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0782] En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado de éste. En ciertas formas de realización, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células B supone la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado anti-CD79b y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, como los que se proporcionan más adelante. En ciertas formas de realización, un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular supone la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprenda 1) un inmunoconjugado que contenga un anticuerpo anti-CD79b y un agente citotóxico, y, opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional, como los que se proporcionan más adelante.

[0783] En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden unir a CD79b de especies distintas a la humana. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse para unirse a CD79b, por ejemplo, en un cultivo celular que contenga CD79b, en humanos o en otros mamíferos que tengan un CD79b que reaccione con el anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, macaco de Java y macaco de la India, cerdo o ratón). En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado puede utilizarse para que CD79b actúe sobre las células B al poner en contacto un anticuerpo o inmunoconjugado con CD79b para formar un anticuerpo o complejo antígeno-inmunoconjugado, de manera que una citotoxina conjugada del inmunoconjugado ingrese al interior de la célula. En una forma de realización, el anticuerpo CD79b es CD79b humano.

[0784] En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado se puede utilizar en un método para unir CD79b en un sujeto que padezca un trastorno asociado a un aumento de la expresión o de la actividad de CD79b. Dicho método comprende la administración al sujeto del anticuerpo o inmunoconjugado de forma que, en el sujeto, se una el CD79b. En una forma de realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se internaliza en las células B que expresan CD79b. En una forma de realización, CD79b es CD79b humano y el sujeto es un humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que exprese CD79b al que se une un anticuerpo anti-CD79b. Además, el sujeto puede ser un mamífero al que se le ha introducido CD79b (por ejemplo, mediante la administración de CD79b o mediante la expresión de un trasgén que codifique CD79b).

[0785] Un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado puede administrarse a un humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado puede administrarse a

mamíferos no humanos que expresen CD79b que reaccione con el anticuerpo (por ejemplo, primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Sobre esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo pruebas de dosis y periodos de administración).

[0786] Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar solos o junto con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede administrar conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorrubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®), donde la terapia combinada es útil en el tratamiento de cánceres o trastornos de células B, o ambos, como por ejemplo, trastornos proliferativos de células B, incluyendo, linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

[0787] Las terapias combinadas descritas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir con anterioridad, simultáneamente o después de la administración de la terapia o terapias adicionales o complementarias. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden también usar en combinación con radioterapia.

[0788] Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y agente terapéutico adicional o complementario) puede administrarse por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, la vía intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra correctamente mediante infusión de efecto rápido con dosis del anticuerpo o inmunoconjugado cada vez menores. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones vía intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0789] La composición de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención debería formularse, dosificarse y administrarse de una manera consistente empleando una práctica médica adecuada. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno específico que se trate, el mamífero específico cometido a tratamiento, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta posológica y otros factores conocidos por los médicos. El

328

anticuerpo o inmunoconjugado puede formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores ya abordados con anterioridad. Estos son generalmente usados en las mismas dosis y con las mismas vías de administración descritas en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosis descritas en la misma, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía empírica y clínicamente considerada apropiada.

[0790] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se utiliza aislado o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como los quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado y la discreción del médico tratante. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ej. 0,1mg/kg-20mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar aproximadamente entre 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantendría, por lo general, hasta que ocurriese una supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de dosis del anticuerpo o inmunoconjugado se encontraría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunoconjugado. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, una vez por semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba aproximadamente de dos a veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Se puede administrar una mayor carga de dosis inicial, seguida de una o más dosis menores. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis inicial aproximada de 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. No obstante, otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

C. Ensayos de actividad

[0791] Los anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugados de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físico-químicas o por sus actividades biológicas, o ambas, mediante varios ensayos conocidos en la especialidad.

1. Ensayos de actividad

[0792] En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de anticuerpos anti-CD79b o inmunoconjugados de los mismos con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular (por ejemplo, actividad de "destrucción celular"), o la capacidad de inducir la muerte celular, incluida la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados con dicha actividad biológica in vivo o in vitro.

[0793] En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado de éste para inhibir el crecimiento o proliferación celular in vitro. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular son bien conocidos en la materia. Determinados ensayos para la proliferación celular, ejemplificados mediante ensayos "de destrucción de células" descritos en la presente memoria descriptiva, miden la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo™, que está vendido por Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en cultivo a partir de la cuantificación de ATP presente, que indica las células activas metabólicamente. Véase Crouch y col. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, Patente de EE.UU. No. 6602677. El ensayo se puede realizar en un formato de 96 ó 384 pocillos, lo que hace posible su uso para detección automatizada de alto rendimiento (HTS). Véase Cree y col. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento de este ensayo supone añadir un único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células en el cultivo. Ello da lugar a lisis celular y generación de una señal luminiscente producida por una reacción con luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos se pueden registrar mediante un luminómetro o un dispositivo de captura de imágenes mediante cámara CCD. La producción de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (URL).

[0794] Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MMT" un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a formazán mediante reductasa mitocondrial. Como el ensayo CellTiter-Glo™ , este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un citocultivo. Véase, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, y Zhang y col. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

[0795] En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b para inducir muerte celular in vitro. Los ensayos para la inducción de la muerte celular son bien conocidos en la materia. En algunas formas de realización, estos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de integridad de la membrana, como se indica mediante absorción de yoduro de propidio (PI), azul de tripan (véase Moore y col. (1995) Cytotechnology, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo ejemplar de absorción de PI, las células se cultivan en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) enriquecido con 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone) y 2 mM de L-glutamina. De este modo, el ensayo se realiza en ausencia de complemento e inmunocitos efectores. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por

330

placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se adhieran durante la noche. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga diversas concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Las células se incuban durante 3 días. Tras el tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el pellet se resuspende en 3 ml de solución tamponada de unión de Ca^{2+} fría (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$) y se alicuotan en tubos de 35 mm con filtro de 12 x 75 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de la agregación celular. Los tubos reciben entonces el PI (10 µg/ml). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, como se determina mediante absorción de PI.

[0796] En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b o inmunoconjugado para inducir la apoptosis (muerte celular programada) in vitro. Un ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen la apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo ejemplar de unión a anexina, las células se cultivan y se siembran en placas tal y como se describe en el párrafo anterior. Después, el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga de 0,001 a 10 µg /ml del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un período de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Después, las células se centrifugan, se resuspenden en un tampón de unión a Ca^{2+} y se alicuotan en tubos tal y como se describe anteriormente. Después, se añade a los tubos la anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg /ml). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto a controles. Otro ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico ELISA con complejos ADN-histonas para la detección de degradación internucleosomal de ADN genómico. Este ensayo se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, el Kit Cell Death Detection ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

[0797] Las células para uso en cualquiera de los ensayos in vitro anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan naturalmente CD79b o que se han diseñado para expresar CD79b. Estas células incluyen células tumorales que sobreexpresan CD79b con respecto a células normales del mismo origen tisular. Estas células también incluyen líneas celulares (incluidas líneas celulares tumorales) que expresan CD79b y líneas celulares que normalmente no expresan CD79b pero han sido transfectadas con ácido nucleico que codifica CD79b.

[0798] En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento o proliferación celular in vivo. En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Los sistemas de modelos in vivo, como modelos

xenotrasplantados, se pueden utilizar para estas pruebas. En un sistema xenotrasplantado ejemplar, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano inmunodeprimido apto, por ejemplo, un ratón SCID. Se administra al animal un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado para inhibir o reducir el crecimiento tumoral. En ciertas formas de realización del sistema xenotrasplantado anterior, las células tumorales humanas son células tumorales procedentes de un paciente humano. Estas células, que son útiles para preparar modelos xenotransplantados, incluyen leucemia humana y líneas celulares de linfomas, que incluyen, entre otras, las células BJAB-luc (una línea celular de linfoma de Burkitt EBV-negativa transfectada con el gen indicador de luciferasa), células Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), células SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, AAC 495), células DoHH2 (véase Kluin-Nelemans, H.C. y col., Leukemia 5:221-224 (1991), y Kluin-Nelemans, H.C. y col., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), células Granta-519 (véase Jadayel, D.M. y col., Leukemia 11(1):64-72 (1997)). En ciertas formas de realización, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano debidamente inmunodeprimido mediante inyección subcutánea o mediante trasplante en un sitio apto, como paníeulos adiposos mamarios.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

[0799] En un aspecto, se prueba la actividad de unión de un anticuerpo anti-CD79b al antígeno. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD79b para unirse a CD79b expresado en la superficie de una célula. Para realizar esta prueba, pueden utilizarse un ensayo FACS.

[0800] En un aspecto, se pueden utilizar análisis de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que compita con el anticuerpo murino 2F2 o el anticuerpo humanizado 2F2.D7 para unirse con CD79b. En ciertas formas de realización, este anticuerpo competitivo se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epitomo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo murino 2F2 o un anticuerpo humanizado 2F2.D7. Entre los ensayos de competición ejemplares se incluyen, entre otros, los ensayos habituales como los indicados en Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítopo al que se une un anticuerpo se señalan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítopo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50% o más.

[0801] En un ensayo de competición ejemplar, se incuba CD79b inmovilizado en una solución que comprende primero a un anticuerpo marcado que se une a CD79b (por ej., anticuerpo murino 2F2 o anticuerpo humanizado 2F2.D7) y segundo a un anticuerpo no marcado, del que se está probando su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse a CD79b. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un CD79b inmovilizado en una solución que contenga el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación en condiciones que favorezcan la unión del primer anticuerpo a CD79b, se elimina el anticuerpo

no unido sobrante y se mide la cantidad de marcador asociada a CD79b inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociada a CD79b inmovilizado es sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primero para la unión a CD79b. En ciertas formas de realización, un CD79b inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que exprese CD79b en su superficie.

[0802] En un aspecto, los anticuerpos purificados anti-CD79b se pueden caracterizar además mediante una serie de ensayos que incluyen, entre otros, la secuenciación del extremo N-terminal, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución no desnaturalizante de exclusión por tamaño (HPLC), la espectrometría de masas, la cromatografía de intercambio iónico y la digestión con papaína.

[0803] En una forma de realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que tiene algunas, pero no la totalidad, de las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo in vivo es importante, pero determinadas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o dañinas. En ciertas formas de realización, se miden las actividades Fc del anticuerpo para asegurar que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro o in vivo para confirmar la reducción/depleción de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) pueden realizarse para asegurar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (por eso es probable que carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de EE.UU. No. 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para tales ensayos se encuentran las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC) y las células asesinas (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como el que se detalla en Clynes y col., PNAS (USA), 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo los ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse al C1q y por ello carece de actividad CDC. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996). También se pueden realizar determinaciones de unión al FcRn y eliminación/semivida in vivo mediante métodos conocidos en la materia.

[0804] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y de ningún modo se proponen limitar el alcance de la presente invención.

[0805] El contenido de todas las patentes y referencias bibliográficas citadas en la presente especificación se incorporan íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

EJEMPLOS

[0806] Los reactivos comercializados a los cuales se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos utilizados en los ejemplos incluyen anticuerpos disponibles comercialmente. La fuente de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la especificación, por números de registro de la ATCC, es la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpo humanizado anti-CD79b

[0807] La numeración de los residuos se realiza de acuerdo con Kabat (Kabat *y col., Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Para las abreviaturas de los aminoácidos se usa una sola letra. Las degeneraciones de ADN se representan usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T).

[0808] El anticuerpo quimérico 2F2 (denominado en la presente memoria descriptiva "ch2F2") se generó según se describió previamente en la solicitud de patente de EE.UU. No. 11/462.336, presentada el 3 de agosto de 2006.

A. Injerto de anticuerpo humanizado anti-CD79b

[0809] Se generó un anticuerpo humanizado anti-CD79b. Los dominios VL y VH del anticuerpo murino 2F2 (mu2F2) se alinearon con las secuencias de consenso de los subgrupos VL kappa I (huKI) y dominios VH III humano (huIII). Para llevar a cabo el injerto de la HVR, se utilizó el VH de la estructura del aceptor, que difiere del dominio VH de la estructura de consenso humana del subgrupo III en 3 posiciones: F71A, I73T y L78A fue utilizado (Carter *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)) Las regiones hipervariables para el anticuerpo murino 2F2 (mu2F2) fueron diseñadas en la estructura humana de consenso para generar un injerto directo HVR de 2F2 (en adelante referido como "injerto 2F2" o "anticuerpo humanizado 2F2-injertado " o "injerto hu2F2"). En el dominio VL, las siguientes regiones se injertaron al aceptor de consenso humano: las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) (Figura 7). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 93-102 (H3) (Figuras 8A-B). MacCallum y col. (MacCallum *y col., J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996)) analizaron complejos de estructuras cristalinas de anticuerpo y antígeno y encontraron que las posiciones 49, 93 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto y por lo tanto se incluyen en la definición de HVR-H2 y HVR-H3 cuando se humanizan anticuerpos.

[0810] La variante de injerto directo (injerto 2F2) fue generada por mutagénesis de Kunkel, debido a que tanto Fab se mostraba en el fago y como una IgG, utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Los clones correctos se evaluaron mediante secuenciación del ADN.

B. Variantes de injerto de anticuerpo humanizado anti-CD79b

[0811] Las variantes de injerto de anticuerpo anti-CD79b, que incluyeron diversidad mutacional en las regiones hipervariables del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2, se generaron utilizando bibliotecas de fagos. Las variantes del injerto del anticuerpo anti-CD79b incluyen variaciones en múltiples posiciones en los HVR (Figura 9).

C. Selección de fago

[0812] Para la selección de fago se inmovilizó huCD79b$_{ecd}$ (2 µg/ml) en PBS en placas de microtitulación MaxiSorp (Nunc) durante la noche a 4 °C. Las placas de bloquearon por al menos 1 h usando Casein Blocker (Pierce). Los fagos se recogieron del sobrenadante del cultivo y se suspendieron en PBS que contenía BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,05% (PBSBT). Después de la adición de la biblioteca de fagos y la selección de fagos por 2 horas, le lavaron los pozos de microtitulación con PBS conteniendo 0,05 % Tween 20 (PBST) para remover el fago no unido y elución del fago unido por incubación de los pozos con 100 mM de HCl por 30 min. Se puede incrementar la rigurosidad de la selección durante las rondas sucesivas de selección al aumentar el número de lavadas con PBST o incubando con huCD79b$_{ecd}$ soluble para incrementar los períodos previos a la elución.

[0813] El fago eluido se neutralizó con 1 M Tris, pH 8 y se amplificó utilizando células azules XL1 y M13/KO7 fago adyuvante y crecimiento durante la noche a 37 °C en 2YT, 50 µg/ml de carbenacilina. Los títulos de los fagos eluidos de un pocillo que contenía el objetivo se compararon con los títulos de los fagos recuperados de un pocillo que no contenía el objetivo, con el fin de evaluar el enriquecimiento.

D. Producción de Fab y producción de IgG

[0814] Para expresar la proteína Fab para mediciones de afinidad, se introdujo un codón de terminación entre la cadena pesada y g3 en el vector de presentación en fagos. Los clones se transformaron en células de E. coli 34B8 y se cultivaron en medio C.R.A.P. completo a 30°C (Presta y col. *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). Se recogieron las células por centrifugación, suspendidas en PBS, 100 µM PMSF, 100 µM benzamidina, 2,4 mM EDTA y abrieron utilizando un microfluidizador. El Fab se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína G.

[0815] Para fines de cribado, las variantes de IgG se produjeron inicialmente en células 293. Los vectores que codificaban VL y VH (25 µg) fueron transferidos a células 293 usando el sistema FuGene. 500 µl de FuGene se mezclaron con 4,5 ml de medio DMEM sin contener FBS e incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Cada cadena (25 µg) se agregó a esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 20 min y se transfirió posteriormente a un matraz para transfección durante la noche a 37 °C en CO_2 al 5%. Al día siguiente, se removieron los medios que contenían la mezcla de transfección y se reemplazaron por 23 ml de medios PS04 con 0,1 ml/L de oligoelementos y 10 mg/L de inulina. Se incubaron las células

durante otros 5 días, tras lo cual se cosecharon los medios a 1000 rpm durante 5 minutos y se sometieron a filtrado estéril usando un filtro con baja unión de proteínas de 0,22 µm. Las muestras podrían almacenarse a 4 °C tras la adición de 2,5 ml 0,1% PMSF cada 125 ml de medios.

E. Determinación de la afinidad (análisis de Biacore)

[0816] Para la determinación de la afinidad de las variantes de los anticuerpos "humanizados" injertados 2F2, el dominio extracelular de CD79b (huCD79b$_{ecd}$) humano se expresó solo en células CHO o como fusión de Fc (huCD79b$_{ecd}$-Fc) y se purificó por medios convencionales. Además, un péptido de 16 aminoácidos (APSEDEYPNPKGSACK) (Identificación de secuencia número: 78) conteniendo el epítopo de 2F2 se sintetizó por medios convencionales.

[0817] La caracterización del epítopo del anticuerpo 2F2 (marcado como "péptido de prueba" en la Figura 14) se divulgó previamente en la Solicitud de patente de los EE.UU. No. 11/462.336, presentada el 3 de agosto de 2006. El epítopo del anticuerpo 2F2 fue localizado en la región del péptido extracelular distal al dominio transmembrana y se presentó en las formas de extensión completa y truncada de CD79b humano (Cragg, *Blood*, 100(9): 3068-76 (2002)), que han sido descritas en células B malignas y normales (Hashimoto, S. y col., *Mol. Immunol.*, 32(9): 651-9 (1995); Alfarano y col., *Blood*, 93(7): 2327-35 (1999)). La forma truncada de CD79b carece de la totalidad del dominio similar a la Ig (el dominio extracelular similar a la Ig que no está presente en la forma empalmada y truncada de CD79b está en un recuadro en la Figura 14).

[0818] La unión de variantes de Fab e IgG de ch2F2, el anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2 injerto) o la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2.D7) a huCD79b$_{ecd}$ o CD79b-Fc inmovilizado o el péptido de 16 aminoácidos que contienen el epítopo para 2F2 se midió por resonancia de superficie del plasma. Las determinaciones de afinidad se realizaron por resonancia de superficie de plasma utilizando un BIAcore^{TM}-2000. El antígeno, huCD79b$_{ecd}$ o huCD79b-Fc se inmovilizó (aproximadamente 50 – 200 RU) en acetato de sodio 10 mM pH 4,8 en un chip detector CM5. En experimentos que midieron la unión del péptido de 16 aminoácidos (APSEDEYPNPKGSACK) (Identificación de secuencia número: 78) que contenía el epítopo (aminoácidos 1-11 de Identificación de secuencia número: 78) para 2F2, se capturó el péptido biotinilado (aproximadamente 20 RU) en un chip detector recubierto con estreptavidina. La variante purificada del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (como Fab o IgG) (como dilución serial doble de 0,5 a 1000 nM en PBST) se inyectó a una velocidad de 30 µL/min. Se analizó cada muestra con una asociación de 4 minutos y una disociación de 10 minutos. Después de cada inyección, se regeneraba el chip utilizando 10 mM de glicina con pH 1,7.

[0819] Se corrigió la respuesta de unión restando una celda de flujo control de la variante del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (como Fab o IgG) de las celdas de flujo. Para el análisis cinético se utilizó un modelo 1:1 de Languir de encaje simultáneo de las constantes k_{on} y k_{off}.

F. Análisis de unión (análisis FACS)

[0820] Para continuar determinando la unión de la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2.D7) derivado de las bibliotecas SF a células BJAB, se analizó la unión de anticuerpos hu2F2.D7 marcados (variantes IgG) a células BJAB utilizando el análisis de FACS.

[0821] Para el análisis FACS, se marcaron anticuerpos monoclonales ch2F2 y 2F2.D7 con Zenon® Alexa Fluor® 488 Human IgG Labeling Kit (Invitrogen, Carlsbad, California), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células BJAB (1 x en 100 µl de volumen) se tiñeron 1 µg/de cada una de anticuerpos marcados, hIgG1 isotipo, ch2F2 ó 2F2.D7.

G. Determinación de la afinidad (análisis de Scatchard)

[0822] Para continuar determinando la unión de variantes IgG de la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2.D7) que tiene cambios en HVF-L3, se analizó la unión de anti-CD79b yodado (con el mismo epítopo que ch2F2) a células BJAB expresando CD79b humano y CD79b cinomólogo utilizando competencia con ch2F2 sin marcar y se realizó el análisis de Scatchard.

[0823] Para el análisis de Scatchard, se compitió 0,5 nM de CD79b antihumano marcado con I^{125} con el mismo epítopo como ch2F2 o 0,5 nM de la variante 7 de anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 marcado con I^{125} (hu2F2.D7) contra ch2F2 o hu2F2.D7 sin marcar, respectivamente, variando de 50 a 0,02 nM (dilución serial 1:2 de 12 pasos) en presencia de una línea transfectada estable de BJAB expresando establemente CD79b cinomólogo y CD79b humano endógeno. Después de una incubación de cuatro horas a 4 °C, se lavaron las células y se contaron los pellets de células con un contador gamma (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Walthem, MA). Todos los puntos se realizaron en triplicado y se contaron durante 10 minutos. Se utilizó el CPM promedio para el cálculo de Kd por medio del programa New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA).

Resultados y comentarios

A. Resultados de la generación de anticuerpo humanizado anti-CD79b

[0824] La estructura humana del aceptor usada para la generación de anti-CD79b humanizado comprende el dominio VL de la estructura de consenso humana kappa I y una variante del dominio VH de consenso humano del subgrupo III. La variante del dominio VH tiene tres cambios con respecto a la estructura de consenso humana: F71A, N73T y L78A. Los dominios VL y VH de 2F2 murino (mu2F2) se alinearon con los dominios kappa I humano y el subgrupo III; se identificó cada HVF y se injertó en la estructura del aceptor humano para generar un injerto HVF que pueda mostrarse como un Fab en el fago (Figuras 7 y 8).

[0825] El fago mostrando el injerto 2F2 como Fab no se unió al $huCD79_{ecd}$ inmovilizado (datos no mostrados). Además, el injerto 2F2 como un Fab no se unió al $huCD79b_{ecd}$ y el injerto 2F2 como un Fab o como una Ig no se unió al $huCD79b_{ecd}$-Fc (Figura 10, NB = no unión) según determinación con análisis Biacore.

337

1. Reparación CDR

[0826] Se identificaron las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 que se pudieron unir al huCD79b$_{ecd}$ inmovilizado con los siguientes cambios de secuencia.

[0827] Solo se observaron cambios de secuencia dirigidas a HVRs en L3 en las bibliotecas que contenían múltiples cambios de posición y que se muestran en la Figura 9 (para mutación L3: W89F y Y96F (2F2.D7 mutación) (Identificación de secuencia número: 18).

[0828] Se reconfiguraron clones seleccionados como Fab para análisis por FACS y como IgG para análisis posteriores por Biacore y Scatchard.

a. Determinación de la afinidad (análisis de Biacore)

[0829] Como se muestra en la Figura 10, que muestra el análisis Biacore, este enfoque de reparación de CDR identificó los cambios de secuencia en HVR-L3 (hu2F2.D7) que restauran la afinidad del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2. El ensayo de resonancia de plasmón de superficie mostró que los cambios en L3 (hu2F2.D7) tenían una afinidad similar (Figura 10) que ch2F2 cuando se unió a huCD79b$_{ecd}$ inmovilizado o al péptido de 16 aminoácidos (Identificación de secuencia número: 78) que contenía el epítopo (aminoácidos 1-11 de Identificación de secuencia número: 78) para 2F2 según se determinó por análisis Biacore.

b. Determinación de la afinidad (análisis de Scatchard)

[0830] Según se determinó por el análisis de Scatchard, este enfoque de CDR reparado identificó cambios de secuencia que mejoraron la afinidad del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2. Específicamente, los ensayos de unión celular mostraron que la afinidad de ch2F2 y la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2.D7) (reconfigurado como IgG) para unir células BJAB que expresan establemente CD79b cinomólogo y CD79b humano endógeno fue con valores Kd de 1 nM (ch2F2; Kd = 0,99 ± 0,23 nM) y 2 nM (hu2F2.D7; Kd = 2,0 ± 0,53 nM), respectivamente (datos no mostrados), como se determinó por análisis de Scatchard.

c. Determinación de unión (análisis FACS)

[0831] Según se determinó por el análisis FACS, este enfoque de reparación de CDR identificó cambios de secuencias que mejoraron la unión del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (injerto hu2F2) a células BJAB (datos no mostrados). Específicamente, el análisis FACS de hu2F2.D7 monoclonal (variantes IgG), identificado de la biblioteca de fagos a células BJAB, mostró unión de la variante hu2F2.D7 a las células BJAB (datos no mostrados).

B. Comentarios de la humanización de los anticuerpos 2F2

[0832] A partir de un injerto de los 6 2F2 HVRs murino (definido como posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 93-102 (H3)) en el consenso humano Kappa I VL y el subgrupo III VH (conteniendo A71, T73 y A78), se utilizó reparación de CDR para identificar cambios en HVR 1-6 que mejoraron la afinidad de unión. Los cambios de secuencia HVR identificados en la Figura 10 condujeron a variantes humanizadas de 2F2 con afinidades similares a ch2F2.

EJEMPLO 2: *Generación de anticuerpos conjugados con fármacos (ACD) de Anti-CD79b*

[0833] Para comprobar la eficacia de las variantes IgG de las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2, se conjugaron las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 a fármacos, como DM1. Las variantes conjugadas con DM1 incluyeron las variantes que tenían cambios en HVR-L3.

[0834] Los fármacos utilizados para la generación de conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) para anticuerpos anti-CD79b incluyeron maitansinoide DM1 y pueden incluir derivados de dolastatina10 monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF). (Véase patente de EE.UU. Nos. 2005/0276812 y 2005/0238649; Doronina y col., *Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006)), DM1, MMAE y MMAF son inhibidores mitóticos que son por lo menos 100 veces más citotóxicos que los inhibidores mitóticos del alcaloide de la vinca utilizados en los tratamientos quimioterapéuticos de NHL (Doronina y col., *Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006); Doronina y col., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003); Erickson y col., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006), cuyas descripciones se incluyen aquí en su totalidad a modo de referencia). Los componentes enlazadores útiles para la generación de ADC son BMPEO, SPP o SMCC (también denominados aquí "MCC") por DM1 y MC o MC-vc-PAB por MMAE y MMAF. Para DM1, se unieron los anticuerpos al grupo tio de DM1 y a través del grupo amino de lisina utilizando el reactivo de enlace SMCC. Como alternativa, para DM1, se pueden unir los anticuerpos a DM1 a través del grupo ε-amino de lisina utilizando el enlazador SPP. El SPP (N-succinimidil 4-(2'-piridilditio) pentanoato) reacciona con el grupo amino epsilon de lisinas para dejar un enlazador reactivo 2-piridil bisulfuro en la proteína. Con enlazadores SPP, al reaccionar con un sulfidral libre (por ej. DM1), se desplaza al grupo piridil, dejando el DM1 unido por medio de un enlace reducible de bisulfuro. El DM1 enlazado por medio de enlazadores SPP se libera en condiciones reductoras (es decir, por ejemplo, dentro de las células) mientras que el DM1 enlazado por medio del enlazador SMCC es resistente a la escición en condiciones de reducción. Además, SMCC-DM1 ADC induce toxicidad celular si el ADC se internaliza y se dirige a la lisosima causando la liberación de lisina-N^{ε}-DM1, que es un agente antimitótico efectivo dentro de la célula; y cuando se libera de la célula, la lisina-N^{ε}-DM1 no es tóxica (Erickson y col., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)) Para MMAE y MMAF, los anticuerpos pueden estar ligados a MMAE o MMAF por la cisteína por el maleimidocaproil-valina-citrulina (vc)-p-aminobenciloxicarbonil (MC-vc-PAB). Para MMAF, los anticuerpos se pueden ligar alternativamente a MMAF por medio de la cisteína por el enlazador maleimidocaproil (MC). El enlazador MC-vc-PAB es escindible por proteasas intercelulares como la catepsina B y cuando se escinde, libera medicamento libre (Doronina y col., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)) mientras que el enlazador MC es resistente a la escición por proteasas intracelulares.

[0835] Los conjugados de fármaco con anticuerpos (ADC) para anti-CD79b, utilizando SMCC-DM1, se generaron de manera similar al procedimiento descrito en la patente de EE.UU. No. 2005/0276812. Los anticuerpos purificados anti-CD79b se reemplazaron con tampón a una solución conteniendo 50 mM de fosfato de potasio y 2mM EDTA, pH 7,0. Se disolvió SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) en dimetilacetamida (DMA) y se agregó a la solución del anticuerpo para preparar una proporción molar

SMCC/Ab de 10:1. La reacción se llevó a cabo por tres horas a temperatura ambiente con mezclado. Subsecuentemente, se purificó el anticuerpo modificado SMCC en una columna de desalinización GE Healthcare HiTrap (G-25) equilibrada en 35 mM de citrato de sodio con 150 mM NaCl y 2 mM EDTA, pH 6,0. DM1, disuelta en DMA, se agregó a la preparación del anticuerpo SMCC para proporcionar una proporción molar de DM1 a anticuerpo de 10:1. La reacción se llevó a cabo por 4 a 20 h a temperatura ambiente con mezclado. La solución de anticuerpo modificado DM1 fue diafiltrada con 20 volúmenes de PBS para eliminar el DM1 sin reaccionar, filtrada estérilmente, y almacenada a 4 grados C. Típicamente, se logró una producción de 40 a 60% de anticuerpo con este proceso. La preparación fue usualmente monomérica >95%, según se determinó por filtración de gel y dispersión de luz láser. Debido a que DM1 tiene una absorción máxima en 252 nm, la cantidad de fármaco ligado al anticuerpo se puede determinar por mediciones de absorción diferencial a 252 y 280 nm. Típicamente, la proporción de fármaco a anticuerpo fue 3 a 4.

[0836] Es posible generar los conjugados de fármacos con anticuerpos (ADC) para anti-CD79b que se detallan en la presente memoria descriptiva utilizando enlazadores SPP-DM1 de manera similar al procedimiento descrito en la patente de EE.UU. No. 2005/0276812. Los anticuerpos CD79b purificados se reemplazaron con tampón a una solución que contenía 50 mM de fosfato de potasio y 2 mM EDTA, pH 7,0 SPP (Immunogen) se disolvieron en DMA y se agregaron a la solución de anticuerpo para preparar una proporción molar final SPP/Ab de aproximadamente 10:1. La proporción exacta dependió de la carga deseada del anticuerpo en el fármaco. Una proporción 10:1 usualmente resultará en una proporción de fármaco a anticuerpo de aproximadamente 3:4. Se permite reaccionar al SPP por 3 a 4 horas a temperatura ambiente con mezclado. Subsecuentemente se purificó el anticuerpo modificado SPP en una columna de desalinización GE Healthcare HiTrap (G-25) equilibrada en 35 mM de citrato de sodio con 150 mM NaCl y 2 mM EDTA, pH 6,0 o solución salina fosfatada, pH 7,4. Se disuelve DM1 en DMA y se agrega a la preparación SPP del anticuerpo para producir una proporción molar de DM1 a anticuerpo de 10:1, que resulta en un exceso de 3 a 4 veces sobre los enlazadores SPP disponibles en el anticuerpo. La reacción con DM1 se permite proceder por 4 a 20 h a temperatura ambiente con mezclado. La solución de anticuerpo modificado DM1 se diafiltra con 20 volúmenes de PBS para eliminar el DM1 sin reaccionar, se filtra estérilmente, y se almacena a 4 grados C. Típicamente, se logra una producción de 40 a 60% de anticuerpo con este proceso. El conjugado de anticuerpo con fármaco es usualmente monomérico >95% según se determinó por filtración de gel y dispersión de luz láser. La cantidad de fármaco unido se determina por mediciones del diferencial de absorción a 252 y 280 nm, según se describió para la preparación de conjugados de SMCC-DM1 (descrito anteriormente).

[0837] Los conjugados de fármaco con anticuerpos (ADC) para anticuerpos anti-CD79b detallados en la presente memoria descriptiva que usan enlazadores fármacos MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE o MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF también pueden generarse de manera similar al procedimiento descrito en la patente de EE.UU. No. 2005/0238649. El anticuerpo purificado anti-CD79b se disuelve en 500 mM de borato de sodio y 500 mM de cloruro de sodio a pH 8,0 y se trata además con

más de 100 MM ditiotreitol (DTT). Después de incubarlo a 37 grados C durante aproximadamente 30 minutos, se sustituye la solución tamponada por elución con resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con 1 mM DTPA. Se controla el valor tiol/anticuerpo mediante la determinación de la reducción de la concentración de anticuerpos a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido se disuelve en PBS que se enfrió con hielo. El enlazador con fármacos, por ejemplo, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE, en DMSO, se disuelve en acetonitrilo y agua, y se agrega al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de una hora de incubación, se agrega un exceso de maleimido para inhibir la reacción y cubrir cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante centrifugación de ultrafiltración y el anticuerpo conjugado con un fármaco se purifica y se desalina por elución con resina G25 en PBS, filtrada a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

[0838] Conjugados de fármaco con anticuerpo (utilizando anticuerpos anti-CD79b descritos en la presente memoria descriptiva) se diluyeron a 2 x 10 µg/ml en medio de ensayo. Los conjugados se enlazaron con reticulantes SMCC (como alternativa se puede utilizar enlazador de bisulfuro para SPP a toxina maitansinoide DM1) (Véase las patentes de EE.UU. Nos. 2005/0276812 y 2005/0238649). Además, los conjugados se pueden enlazar con MC-valina-citrulina (vc)-PAB o MC a derivados de dolastatina10, toxina de monometilauristatina E (MMAE) o toxina de monometilauristatina F (MMAF) (Véase solicitudes de patentes de los EE.UU. Nos. 11/141.344, presentadas el 31 de mayo de 2005 y la solicitud de patente de EE.UU. No. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004). Los controles negativos incluyeron conjugados basados en HERCEPTIN® (trastuzumab) (anti-HER2) (SMCC-DM1 o SPP-DM1 o MC-vc-MMAE o MC-vc-MMAF). Los controles positivos pueden incluir L-DM1 libre equivalente a la dosis de carga del conjugado. Se mezclaron las muestras para asegurar una mezcla homogénea antes de la dilución.

[0839] Los anticuerpos anti-CD79b para el conjugado con fármaco incluyeron anticuerpos quiméricos 2F2 (descritos en el Ejemplo 1A) y los demás anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva (véase el Ejemplo 1), incluyendo hu2F2.D7.

EJEMPLO 3: Ensayo de destrucción de células tumorales *in vivo*

A. Xenotransplantes

[0840] Para comprobar la eficacia de las variantes IgG de las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado de 2F2 que tienen cambios en HVR-L3 (hu2F2.D7), se conjugó la variante hu2F2.D7 a DM1 y se analizó el efecto de la variante conjugada en tumores en ratones.

[0841] Específicamente, se puede examinar la capacidad de los anticuerpos para revertir tumores en múltiples modelos de xenotranplante, incluyendo células RAMOS, células BJAB (línea celular del linfoma de Burkitt que contiene la translocación t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC), un gen p53 mutado y que son virus de Epstein-Barr (EBV) negativo) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book*, San Diego: Academic Press, 2001)), células Granta 519 (línea celular de linfoma de células del manto que

contienen la translocación t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH) que resulta en una sobreexpresión de la ciclina D1 (BCL1), que contiene deleciones P16INK4B y P16INK4A y son EBV positivo) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book,* San Diego: Academic Press, 2001)), células U698M (línea celular de linfosarcoma B linfoblástico; (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book*, San Diego: Academic Press, 2001) y células DoHH2 (línea celular de linfoma folicular que contiene la translocación característica del linfoma folicular t(14;18)(q32;q21) que resulta en la sobreexpresión de Bcl-2 conducido por la Ig de cadena pesada, que contiene la deleción P16INK4A, y la translocación t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC) y es EBV negativo) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book*, San Diego: Academic Press, 2001)), puede ser examinada.

[0842] Para el análisis de eficacia de las variantes del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2, se inocularon ratones hembra CB17 ICF SCID (6-8 semanas de edad de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) subcutáneamente con 2 x 10^7 células BJAB-luciferasa o células Granta-519 por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICF SCID y se permitió el crecimiento de los tumores xenotrasplantados a un promedio de 200 mm^2. El día 0 se refiere al día que los tumores tenían un promedio de 200 mm^2 y cuando se administró la primera o única dosis del tratamiento, a menos que se indique específicamente a continuación. El volumen del tumor se calculó basado en dos dimensiones, medido utilizando calibradores, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2, dónde a y b son los diámetros mayor y menor del tumor, respectivamente. Los datos recogidos de cada grupo experimental se expresaron como media +- error estándar. Se trataron a grupos de 10 ratones con una sola dosis intravenosa (i.v.) entre 50 y 210 µg de anticuerpo unido al fármaco/m^2 del ratón (correspondiente a ~1-4 mg/kg del ratón) con variantes "humanizadas" del anticuerpo injertado 2F2 o conjugados de anticuerpo-fármaco de control. Los tumores se midieron una o dos veces por semana durante todo el experimento. El peso corporal se midió una o dos veces por semana durante todo el experimento. Los ratones fueron sometidos a eutanasia antes de que el volumen de los tumores alcanzase los 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de impedir la ulceración. Un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales aprobó todos los protocolos de animales (IACUC, por sus siglas en inglés).

[0843] Los componentes enlazadores entre el anticuerpo y la toxina que se utilizaron fueron reticulaciones de tío éter SMCC para DM1. Componentes enlazadores adicionales pueden incluir enlazadores de bisulfuro SPP o reticulaciones de tioéter SMCC para DM1 o MC o MC-valina-citrulina(vc)-PAB o reactivo de (a valina-citrulina (vc)) dipéptido de enlace) teniendo un componente maleimido y un componente para-aminobenzilcarbamil (PAB) autoinmolador para monometilauristatina E (MMAE) o monometilauristana F (MMAF). Las toxinas utilizadas fueron DM1. Las toxinas adicionales pueden incluir MMAE o MMAF.

[0844] Los anticuerpos CD79b para este experimento incluyeron anticuerpos quiméricos 2F2 (ch2F2) descritos en la Solicitud de patente de los EE.UU. No. 11/462.336, presentada el 3 de agosto de 2006 (véase el Ejemplo 1A) así como variantes del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 descritas en esta

342

memoria descriptiva (véase el Ejemplo 1). Los anticuerpos adicionales pueden incluir anticuerpos 2F2 generados por hibridomas depositados en el ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

[0845] Controles negativos incluyeron conjugados basados en HERCEPTIN® (trastuzumab) (anti-HER2) (SMCC-DM1).

B. Resultados

1. Xenotrasplantes BJAB-Luciferasa

[0846] En el transcurso de 36 días, la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (variante hu2F2.D7) (reconfigurados como IgG) (y anticuerpo quimérico anti-CD79b (ch2F2) conjugado a DM1 (hu2F2.D7-SMCC-DM1 y ch2F2-SMCC-DM1, respectivamente), mostró inhibición del crecimiento del tumor en ratón SCID con tumores BJAB-luciferasa comparado con el control negativo, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC se administró en una dosis única (según se indica en la Tabla 7) al día 0 de todos los ADC y los controles. Específicamente, los anticuerpos hu2F2.D7-SMCC-DM1 (reconfigurados como IgG) y ch2F2–SMCC-DM1 inhibieron de manera significativa el crecimiento tumoral (Figura 19). Además, en la Tabla 7, se indica el número de ratones del total estudiado que mostró RP = Regresión Parcial (cuando el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración se redujo por debajo de 50% del volumen del tumor medido en el día 0) o RC = Remisión Completa (cuando el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración se redujo a 0 mm^3).

Tabla 7: Xenotrasplante BJAB-Luc (20 millones células/ratón) en ratón SCID

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	RP	RC	Dosis Ab (mg/kg)	Dosis fármaco – DM1 ($\mu g/m^2$)	Proporción fármaco (Fármaco/ Ab)
Control anti-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	2	100	3,3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	1/10	2,3	100	3
ch2F2-SMCC-DM1	0/10	0/10	1,2	50	3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	1/10	2,9	100	2,3
hu2F2.D7-SMCC-DM1	1/10	0/10	1,5	50	2,3

2. Xenotrasplantes Granta-519 (linfoma humano de células del manto)

[0847] En el transcurso de 14 días, la variante 7 del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 (hu2F2.D7 variante) (reconfigurado como IgG) (hu2F2.D7-SMCC-DM1), mostró inhibición de crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores Granta-519 comparado con el control negativo, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC se administró en una dosis única (según se indica en Tabla 8) al día 0 de todos los ADC y los controles. Específicamente, los

anticuerpos hu2F2.D7-SMCC-DM1 (reconfigurados como IgG) inhibieron de manera significativa el crecimiento tumoral (Figura 20A).

[0848] Además, el tratamiento con hu2F2.D7-SMCC-DM1 y control con HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) no resultó en una disminución en el porcentaje de peso corporal de los ratones (Figura 20B). Además, en Tabla 8, se indica el número de ratones del total estudiado que mostró PP = Regresión Parcial (cuando el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración se redujo por debajo de 50% del volumen del tumor medido en el día 0) o PC = Remisión Completa (cuando el volumen del tumor en cualquier momento después de la administración se redujo a 0 mm^3).

Tabla 8: Xenotrasplante Granta-519 (20 millones células/ratón) en ratones SCID

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	PP	PC	Dosis Ab (mg/kg)	Dosis fármaco – DM1 ($\mu g/m^2$)	Proporción fármaco (Fármaco/ Ab)
Control anti-HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	206	3,4
hu2F2.D7-SMCC-DM1	0/10	0/10	4	166	2,8

[0849] A la luz de la capacidad del ADC del anticuerpo "humanizado" injertado 2F2 par inhibir de manera significativa la progresión tumoral en xenotrasplantes, las moléculas de CD79b podrían ser excelentes objetivos para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo el cáncer asociado a las células B, como linfomas (es decir, linfoma no Hodgkin), leucemias (como la leucemia linfocítica crónica) y otros cánceres de las células hematopoyéticas. Además, los ADC "humanizados" injertados 2F2 son útiles para reducir in vivo el crecimiento de tumores, incluyendo cáncer asociado con las células B, como linfomas (es decir, linfoma no Hodgkin), leucemias (como leucemia linfocítica crónica) y otros cánceres de las células hematopoyéticas.

EJEMPLO 4: Colocalización de anticuerpo CD79b

[0850] Para determinar dónde se administran los anticuerpos "humanizados" injertados 2F2 y las variantes de anticuerpos al internalizarse en la célula, se pueden realizar estudios de colocalización de los anticuerpos anti-CD79b internalizados en las líneas de las células B en las líneas celulares Ramos. LAMP-1 es un marcador de endosomas y lisosomas tardíos (Kleijmeer y col., *Journal of Cell Biology*, 139(3): 639-649 (1997); Hunziker y col., *Bioessays*, 18:379-389 (1996); Mellman y col., *Annu. Rev. Dev. Biology*, 12:575-625 (1996)), incluyendo compartimentos MHC clase II (MIIC), que son compartimentos similares a endosoma/lisosoma tardío. HLA-DM es un marcador para MIIC.

[0851] Las células Ramos se incuban por 3 horas a 37 °C con 1 µg/ml de anticuerpos "humanizados" injertados 2F2 y variantes de anticuerpos, bloque FcR (Miltenyi) y 25µg/ml Alexa647-

Transferrina (Molecular Probes) en un medio completamente libre de carbonato (Gibco) con la presencia de 10µg/ml de leupeptina (Roche) y 5µM pepstatina (Roche) para inhibir la degradación lisosómica. Después se lavan las células dos veces, se fijan con paraformaldehído al 3% (Electron Microscopy Sciences) por 20 minutos a temperatura ambiente, se absorben con 50 mM NH4Cl (Sigma), se permeabilizan con 0,4% Saponin/2% FBS/1% BSA por 20 minutos y después se incuban con 1 µg/ml Cy3 anti-ratón (Jackson Immunoresearch) por 20 minutos. Después se bloquea la reacción por 20 minutos con IgG de ratón (Molecular Probes), seguido de una incubación de 30 minutos con potenciador de señal Image-iT FX (Molecular Probes). Finalmente, se incuban las células con anti-LAMP1 (BD Pharmingen) de ratón marcado con Zenon Alexa488, un marcador tanto para lisosomas como para MIIC (un compartimiento similar al lisosoma que es parte de la vía MHC clase II), por 20 minutos y se fijan posteriormente con 3% PFA. Se resuspenden las células en 20µl de tampón saponina y se les permite adherirse al portaobjetos recubierto de poli-lisina (Sigma) antes de montar en cubreobjetos con VectaShield (Vector Laboratories) que contenga DAPI. Para la inmunofluorescencia del MIIC o lisosimas, se fijan las células, permeabilizan y capacitan según se describió anteriormente, después se les tiñe también con Zenon marcado Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) y Alexa488-Lamp1 en presencia de exceso de IgG de ratón según las instrucciones del fabricante (Molecular Probes).

[0852] Por tanto, la colocalización de anticuerpos "humanizados" injertados 2F2 o variantes del anticuerpo con MIIC o lisosimas de líneas de células B según se determinó por inmunofluorescencia puede indicar que las moléculas son agentes excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cáncer asociado con las células B, como linfomas (es decir, linfoma no Hodgkin), leucemias (como leucemia linfocítica crónica) y otros cánceres de las células hematopoyéticas.

EJEMPLO 5: Preparación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína

[0853] La preparación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína se realizó tal como se reveló en la presente memoria descriptiva.

[0854] El ADN que codifica el anticuerpo ch2F2 (cadena ligera, Identificación de secuencia número: 4, Figura 4; y cadena pesada, Identificación de secuencia número: 5, Figura 5), se puede mutagenizar por los métodos presentados en la presente memoria descriptiva para modificar la cadena ligera y la cadena pesada.

[0855] El ADN que codifica el anticuerpo hu2F2.D7 (cadena pesada, (Identificación de secuencia número: 90) y cadena ligera (Identificación de secuencia número: 89), Figura 13) se mutagenizó por los métodos presentados en la presente memoria descriptiva para modificar la cadena pesada. El ADN que codifica el anticuerpo hu2F2.D7 (cadena pesada, (Identificación de secuencia número: 90), Figura 13), también se puede mutagenizar por los métodos presentados en la presente memoria descriptiva para modificar la región Fc de la cadena pesada.

[0856] En la preparación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína, la codificación del ADN de la cadena ligera se mutagenizó para sustituir la cisteína por valina en la posición Kabat 205 en la cadena ligera (posición secuencial 210) como se muestra en la Figura 18 (cadena ligera, identificador de secuencia n.º: 88 de hu2F2.D7 thioMAb). La codificación de ADN de la cadena pesada se mutagenizó para sustituir la cisteína por alanina en la posición EU 118 en la cadena pesada (posición secuencial 118; número Kabat 114) como se muestra en la Figura 17 (cadena pesada, identificador de secuencia n.º: 85 de hu2F2.D7 thioMAb). La región Fc de los anticuerpos anti-CD79b se puede mutagenizar sustituyendo la cisteína por serina en la posición EU 400 en la región Fc de la cadena pesada (posición secuencial 400; número Kabat 396) como se muestra en las Tablas 2 a 3.

A. Preparación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína para conjugarlos mediante reducción y reoxidación

[0857] Los anticuerpos monoclonales anti-CD79b de longitud completa, diseñados con cisteína (ThioMabs), se expresan en células CHO y se purifican en una cromatografía de afinidad en proteína A seguida por una cromatografía de exclusión por tamaño. Los anticuerpos purificados se reconstituyen en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a un pH de aproximadamente 8,0 y se reducen con un exceso de alrededor de 50-100 veces de TCEP (hidrocloruro de (tris(2-carboxietil)fosfina) 1 mM; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante aproximadamente 1 a 2 horas a 37ºC. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. El ThioMab reducido y eluido se trata con 2 mM de ácido deshidroascórbico (dhAA) a un pH 7 durante 3 horas o 2 mM de sulfato de cobre acuoso ($CuSO_4$) a temperatura ambiente durante la noche. La oxidación al aire del ambiente también puede ser eficaz. El tampón se cambia por medio de la elución con la resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con un 1 mM de DTPA. Se controla el valor tiol/anticuerpo mediante la determinación de la reducción de la concentración de anticuerpos a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

EJEMPLO 6: Preparación de conjugados de anticuerpos anti-CD79b con fármacos diseñados con cisteína por conjugación de anticuerpos anti-CD79b diseñados con cisteína e intermediarios fármaco-enlazador

[0858] Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 5, el anticuerpo anti-CD79b diseñado con cisteína se reconstituye en un tampón de PBS (solución salina fosfatada) y se enfría en hielo. Aproximadamente, 1,5 equivalentes molares con respecto a las cisteínas diseñadas por anticuerpo de un intermediario fármaco auristatina-enlazador, como MC-MMAE (maleimidocaproilo-monometilo auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional de reactivos de tiol, como la maleimida, se disuelve en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua y se añade al anticuerpo nuevamente oxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se agrega un exceso de maleimido para inhibir la reacción y cubrir cualquier

grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo anti-CD79b conjugado con fármacos y diseñado con cisteína se purifica y se desala por elución a través de la resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones de esterilización y se congela para almacenarse.

[0859] La preparación de hu2F2.D7-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1 se puede realizar de la siguiente manera. La cisteína libre en hu2F2.D7-HC(A118C) thioMAb fue modificado por el reactivo bis-maleimida BM(PEO)3 (Pierce Chemical), lo cual dejó un grupo maleimida no reaccionado en la superficie del anticuerpo. Esto se logra mediante la disolución de BM(PEO)3 en una mezcla de 50% de etanol/agua a una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar de BM(PEO)3 de diez veces a una solución que contiene hu2F2.D7-HC(A118C) thioMAb en una solución salina fosfatada de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolares) y permitiendo que reaccione durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)3 es eliminado por la filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en 30 mM de citrato, pH 6 con 150 mM de búfer NaCl. Se agrega un exceso molar de DM1 de 10 veces, aproximadamente, disuelto en dimetilacetamida (DMA) al hu2F2.D7-HC(A118C) thioMAb-BMPEO intermedio. Asimismo, puede emplearse dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo de fracciones de fármaco. La mezcla de reacción se deja reaccionar en una PBS a lo largo de toda noche antes de aplicar la filtración en gel o diálisis a fin de eliminar el fármaco que no haya reaccionado. La filtración en gel en las columnas S200 en PBS se utiliza para eliminar los agregados de alto peso molecular y para suministrar hu2F2.D7-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1 purificado.

[0860] Con los mismos protocolos se puede generar tio control hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, tio control hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, tio control hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE y tio control anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF .

[0861] Por medio de los procedimientos anteriores, es posible preparar y comprobar anticuerpo anti-CD79b conjugado con fármacos y diseñado con cisteína (TDC), por ejemplo pero no limitado a los siguientes:

1. tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MC-MMAF por conjugación de A118C tio hu2F2.D7-HC(A118C) y MC-MMAF;

2. tio hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1 por conjugación de A118C tio hu2F2.D7-HC(A118C) y BMPEO-DM1;

3. tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE por conjugación de A118C tio hu2F2.D7-HC(A118C) y MC-val-cit-PAB-MMAE;

4. tio ch2F2-HC(A118C)-MC-MMAF por conjugación de tio ch2F2-HC(A118C) y MC-MMAF; y

5. tio ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF por conjugación de tio ch2F2-LC(V205C) y MC-MMAF.

EJEMPLO 7: Caracterización de la afinidad de unión de los conjugados de ThioMAb con fármacos diseñados con cisteína al antígeno de superficie celular

[0862] La afinidad de unión de conjugados de fármacos tio hu2F2.D7 y conjugados de fármacos tio ch2F2 a CD79b expresado en células BJAB-luciferasa se determina por análisis de FACS.

[0863] Explicado brevemente, aproximadamente $1x10^6$ células en 100 µl se ponen en contacto con distintas cantidades (1.0 ug, 0.1., ug o 0.01 ug de Ab por millón de células de BJAB-luciferasa) de uno de, pero no limitado a, los siguientes anti-CD79b thioMAb conjugados con fármacos o desnudos (Ab no conjugados como control): (1) tio ch2F2-LC(V205C)-MC-MMAF o (2) tio ch2F2-HC(A118C)-MC-MMAF; (3) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (4) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1, o (5) tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MC-MMAF. Se usa PE conjugado con Ig anti-humana de ratón como anticuerpo secundario de detección (BD Cat#555787).

[0864] El anticuerpo anti-CD79b ligado a la superficie de la célula se detecta usando PE conjugado con Ig anti-humana de ratón.

EJEMPLO 8: Ensayo para la reducción de la proliferación celular in vitro por los conjugados anti-CD79b ThioMab con fármacos

[0865] La potencia *in vitro* de conjugados anti-CD79b ThioMAb con fármacos de (incluyendo pero no limitado a tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCMMAF, tio hu2F2.D7-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE y tio hu2F2.D7-HC(A118C)-BMPEO-DM1), se mide por un ensayo de proliferación celular (por ejemplo en células BJAB-luciferasa, Granta-519, WSU-DLCL2). El Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible comercialmente (Promega Corp., Madison, WI) basado en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (Patentes de EE.UU. Nos. 5583024, 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en un cultivo sobre la base de la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crouch y col., *J. Immunol. Metho.*, 160: 81-88 (1993); patente de EE.UU. No. 6602677). El ensayo CellTiter-Glo® se realiza en el formato de 96 pocillos, lo que hace posible su uso para detección automatizada de alto rendimiento (HTS) (Cree y col., *AntiCancer Drugs*, 6:398-404 (1995)). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo único (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en un medio con suplemento de suero.

[0866] El formato homogéneo de "añadir-mezclar-medir" da como resultado lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. El sustrato, luciferina de luciérnaga, se descarboxila oxidativamente mediante luciferasa recombinante de luciérnaga con la conversión concomitante de ATP a AMP y generación de fotones. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa (ULR). Los datos se pueden registrar mediante un luminómetro o un dispositivo de captura de imágenes mediante cámara CCD. La producción de luminiscencia se presenta como ULR medidas a lo largo del tiempo. %ULR es el porcentaje de ULR normalizado comparado con el

control "no conjugado con fármaco". Alternativamente, el recuento de los fotones de luminiscencia puede realizarse mediante un contador de escintilación en presencia de un centellador. Entonces las unidades de luz pueden representarse como CPS (siglas en inglés de recuento por segundo).

[0867] La eficacia de los conjugados con fármacos de thioMAb se mide por medio de ensayo de proliferación celular empleando el siguiente protocolo, adaptado de ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter Glo, Promega Corp. Boletín Técnico TB288; Mendoza y col., *Cancer Res.*, 62: 5485-5488 (2002)):

1. Se deposita una alícuota de 40 µl de cultivo celular, conteniendo alrededor de 3000 células BJAB, Granta-519 o WSU-DLCL2 en un medio, en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 384 pocillos.

2. Se agrega TDC (Conjugado de fármaco ThioMab) (10 µl) para cuadruplicar los pocillos experimentales a una concentración final de 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 ó 1,5 ng/mL, mientras que los pocillos de control con "conjugado sin fármaco" únicamente reciben el medio y son incubados por 3 días.

3. Las placas se equilibran a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

4. Se agrega el reactivo CellTiter-Glo (50 µl).

5. El contenido se mezcla durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir lisis celular.

6. Las placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.

7. La luminiscencia se registró y se representó en gráficas como %ULR = unidades de luminiscencia relativa. Los datos de las células incubadas con medio libre de conjugado con fármaco se grafican a 0,51 ng/ml.

Medios: Las células BJAB, Granta-519 y WSU-DLCL2 crecen in RPMI1640/10%FBS/2mM glutamina.

EJEMPLO 9: Ensayo de la inhibición in vivo de crecimiento tumoral por conjugados anti-CD79b ThioMab con fármacos

[0868] En un estudio similar, utilizando el mismo protocolo de estudio de xenotransplante como se describe en el Ejemplo 3 (véase previamente), variando los conjugados de fármacos y las dosis administradas, se estudia la eficacia de los conjugados thioMAb con fármacos en la reducción del volumen de tumores de células B en modelos de xenotransplante, por ejemplo, xenotransplantes Granta-519 (linfoma humano de células del manto), xenotransplantes DOHH2 (linfoma folicular), xenotransplantes WSU-DLCL2 (linfoma difuso de células grandes) o xenotransplantes BJAB (linfoma de Burkitt).

[0869] Se considera que lo expuesto hasta el momento en la presente memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en este sector aplique la invención. La presente invención no tiene un ámbito de aplicación limitado por la construcción depositada, dado que el objetivo de la forma de realización depositada es ilustrar determinados aspectos de la invención y cualquier construcción

funcionalmente equivalente está dentro del ámbito de aplicación de esta invención. El depósito de material de la presente memoria descriptiva no constituye reconocimiento alguno de que la descripción escrita contenida en la misma no sea suficiente para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se interpretará de forma que limite el ámbito de aplicación de las reivindicaciones de las ilustraciones específicas que representa. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en esta memoria, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones incluidas más adelante.

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Un anticuerpo anti-CD79b que comprende:

(a) al menos una secuencia HVR seleccionada entre el grupo formado por:

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A16, donde A1-A16 es KSSQSLLDSDGKTYLN (identificador de secuencia n.º: 59)

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, donde B1-B7 es LVSKLDS (identificador de secuencia n.º: 60)

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, donde C1-C9 es WQGTHFPYT (identificador de secuencia n.º: 61)

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, donde D1-D10 es GYTFTSYWMN (identificador de secuencia n.º: 62)

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, donde E1-E18 es GMIDPSDSETHYNHIFKD (identificador de secuencia n.º: 63)

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F6, donde F1-F6 es APNLYL (identificador de secuencia n.º: 64); y

(b) al menos una variante de la HVR, donde la variante de la HVR incluye la modificación de al menos un residuo de la secuencia descrita en los identificadores de secuencia nos.: 59, 60, 61, 62, 63 ó 64.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde C1 en una variante HVR-L3 es F.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde C8 en una variante HVR-L3 es F.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde al menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura de consenso humana.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la modificación es sustitución, inserción o deleción.

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde una variante HVR-L3 comprende una sustitución en cualquiera de las siguientes posiciones: C1 (F) y C8 (F).

8. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un HVR-L1 que tiene la secuencia de identificador de secuencia n.º: 59.

9. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un HVR-L2 que tiene la secuencia de identificador de secuencia n.º: 60.

10. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un HVR-H1 que tiene la secuencia de identificador de secuencia n.º: 62.

11. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un HVR-H2 que tiene la secuencia de identificador de secuencia n.º: 63.

12. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un HVR-H3 que tiene la secuencia de identificador de secuencia n.º: 64.

13. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde C1 en una variante HVR-L3 es F.

14. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde C8 en una variante HVP-L3 es F.

15. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad monovalente del anticuerpo al CD79b humano es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino que comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en la Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

16. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad monovalente del anticuerpo al CD79b humano es por lo menos 1, 2 ó 3 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino o un anticuerpo quimérico que comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en la Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

17. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad monovalente del anticuerpo al CD79b humano es por lo menos 1, 2 ó 3 veces menor que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino o quimérico que comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

18. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 13, 14 ó 15 donde el anticuerpo murino es producido por una línea celular de hibridoma depositado en la ATCC como PTA-7712 el 11 de julio de 2006.

19. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al CD79b humano es sustancialmente la misma que la afinidad de una anticuerpo murino en su forma bivalente y comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en la Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

20. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al CD79b humano es sustancialmente por lo menos 1,2 ó 3 mayor que la afinidad de un anticuerpo murino o un anticuerpo quimérico en su forma bivalente y comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

21. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al CD79b humano es por lo menos 1, 2 ó 3 veces menor que la afinidad de un anticuerpo murino o quimérico en su forma bivalente y comprende secuencias variables de la cadena ligera y de la cadena pesada según se describe en Figura 7 (identificador de secuencia n.º: 10) y las Figuras 8A-B (identificador de secuencia n.º: 14).

22. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al CD79b humano es 2,0 nM.

23. El anticuerpo humanizado anti-CD79 de la reivindicación 22 donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al CD79 humano es 2,0 nM +/- 0,53.

24. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23 donde la afinidad de unión se expresa como un valor Kd.

25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23 donde la afinidad de unión se mide mediante ensayo Biacore o radioinmunoensayo.

26. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende una secuencia de la estructura de consenso humana κ del subgrupo 1.

27. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende una secuencia de la estructura de consenso humana de la cadena pesada del subgrupo III.

28. El anticuerpo de la reivindicación 27, donde la secuencia de la estructura comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/ó 78.

29. El anticuerpo de la reivindicación 28 donde dicha sustitución es R71A, N73T y/o L78A.

30. Un anticuerpo humanizado anti-CD79b 2F2 donde el anticuerpo humanizado inhibe el crecimiento de las células tumorales cuando se conjuga con un agente citotóxico.

31. El anticuerpo de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico son monovalentes o bivalentes.

32. El anticuerpo de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico comprenden una sola región Fab unida a la región Fc.

33. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia HVR1-HC, HVR2-HC y/o HVR3-HC descrita en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 31-33).

34. El anticuerpo de la reivindicación 33, donde el dominio variable comprende las secuencias FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y/o FR4-HC descritas en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 27-30).

35. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34, donde el anticuerpo comprende la secuencia CH1 y/o Fc descrita en (identificador de secuencia n.º: 34 y/ó 35).

36. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias HVR1-LC, HVR2-LC y/o HVR3-LC descritas en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 23-25).

37. El anticuerpo de la reivindicación 36, donde el dominio variable comprende las secuencias FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y/o FR4-LC descritas en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 19-22).

38. El anticuerpo de la reivindicación 36 ó 37, donde el anticuerpo comprende la secuencia CL1 descrita en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 26).

39. El polipéptido que comprende la secuencia descrita en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 12).

40. El polipéptido que comprende la secuencia descrita en la Figura 13 (identificador de secuencia n.º: 16).

41. El anticuerpo hecho por el proceso de:
(a) cultivar una célula que expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 y un dominio variable de la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38 y
(b) aislar el anticuerpo de dicha célula cultivada.

42. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 y un dominio variable de la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38.

43. El anticuerpo de la reivindicación 42, donde el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc.

44. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 12.

45. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 16.

46. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos seleccionadas de los identificadores de secuencia nos.: 69, 70, 71 y 72.

47. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos seleccionadas de los identificadores de secuencia nos.: 65, 66, 67 y 68.

48. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de los identificadores de secuencia nos.: 69, 70, 71 y 72.

49. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de los identificadores de secuencia nos.: 65, 66, 67 y 68.

50. El anticuerpo de la reivindicación 44, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 16.

51. El anticuerpo de la reivindicación 45, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 12.

52. Un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16.

53. Un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12.

54. Un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16 y un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12.

55. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177.

56. Un vector que comprenda el polinucleótido de la reivindicación 55.

57. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 56.

58. Un método para la elaboración de un anticuerpo anti-CD79b, donde el método comprenda (a) el cultivo de una célula huésped seleccionada de un grupo que comprenda una célula eucariótica y una célula CHO bajo condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido que codifica el anticuerpo y (b) el aislamiento del anticuerpo.

59. El anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177, donde el anticuerpo se une con un epítopo dentro de una región de CD79b del aminoácido 29 a 39 del identificador de secuencia n.º: 2 o aminoácido 1 a 11 del identificador de secuencia n.º: 78.

60. El anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177, donde el CD79b se expresa en la superficie de una célula.

61. El anticuerpo de la reivindicación 60, en el que la célula es una célula B.

62. El anticuerpo de la reivindicación 60, en el que la célula B se asocia a un trastorno proliferativo de células B.

63. El anticuerpo de la reivindicación 62, en el que el trastorno proliferativo de células B es un cáncer.

64. El anticuerpo de la reivindicación 63, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

65. El anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

66. El anticuerpo de la reivindicación 65, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o $(Fab')_2$.

67. El anticuerpo de la reivindicación 65, donde el anticuerpo es humanizado.

68. El anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177, donde el anticuerpo se une al mismo epítopo como un anticuerpo seleccionado de ATCC como PTA-7712, depositado el 11 de julio de 2006 y un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada del identificador de secuencia n.º: 16 y un dominio variable de la cadena ligera del identificador de secuencia n.º: 12.

69. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177 unido covalentemente a un agente citotóxico.

70. El inmunoconjugado de la reivindicación 69, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.

71. Un inmunoconjugado de la reivindicación 70 que comprende la fórmula Ab-(L-D)p, donde:
(a) Ab es el anticuerpo de la reivindicación 1, 7, 42, 54 ó 177;
(b) L es un enlazador;
(c) D es una fracción de fármaco.

72. El inmunoconjugado de la reivindicación 71, en el que L se selecciona a partir de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonil (PAB), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB).

73. El inmunoconjugado de la reivindicación 71, en el que D se selecciona a partir de una auristatina y una dolastatina.

74. Una composición farmacéutica que contiene el inmunoconjugado de la reivindicación 71 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

75. Un método de inhibición del crecimiento de una célula que expresa CD79b, dicho método comprende el contacto de dicha célula con un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177, lo que causa la inhibición del crecimiento de dicha célula.

76. El método de la reivindicación 75 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

77. El método de la reivindicación 75 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

78. Un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer, que consiste en administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

79. El anticuerpo de la reivindicación 78, en el que el cáncer se selecciona a partir de linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

80. El método de la reivindicación 78 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

81. El método de la reivindicación 78 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

82. Un método para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto, que consiste en administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

83. El método de la reivindicación 82, donde el trastorno de proliferación es cáncer.

84. El anticuerpo de la reivindicación 83, en el que el cáncer se selecciona a partir de linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

85. El método de la reivindicación 82 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

86. El método de la reivindicación 82 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

87. El método de inhibición del crecimiento de una célula, donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente del efecto potenciador del crecimiento de CD79b, dicho método comprende el contacto de dicha célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177, por lo que inhibe el crecimiento de dicha célula.

88. El método de la reivindicación 87 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

89. El método de la reivindicación 87 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

90. Un método terapéutico para el tratamiento de un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente del efecto potenciador del crecimiento de CD79b, dicho método comprende el contacto de dicha célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

91. El método de la reivindicación 90, en el que el tumor está asociado con linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

92. El método de la reivindicación 90 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

93. El método de la reivindicación 90 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

94. Un método para inhibir la proliferación de células B que comprende la exposición de una célula a un inmunoconjugado de la reivindicación 70 en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a CD79b.

95. El método de la reivindicación 94, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH

indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

96. El método de la reivindicación 94, en el que la célula B es un xenotrasplante.

97. El método de la reivindicación 94, donde la exposición se produce in vitro.

98. El método de la reivindicación 94, donde la exposición se produce in vivo.

99. Un método para determinar la presencia de CD79b en una muestra de la que se sospecha que contiene CD79b, dicho método comprende la exposición de dicha muestra a un anticuerpo de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177 y determinar la unión de dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra donde la unión del dicho anticuerpo a CD79b en dicha muestra es una indicación de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

100. El método de la reivindicación 99, donde la muestra biológica se obtiene de un paciente que se cree que padece un trastorno proliferativo de células B.

101. El método de la reivindicación 100, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir entre linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

102. Un método de unir un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177 a una célula que expresa CD79b, dicho método comprende el contacto de dicha célula con un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

103. El método de la reivindicación 102 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente citotóxico.

104. El método de la reivindicación 102 donde dicho anticuerpo es conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.

105. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

106. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 105.

107. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43.

108. La composición de la reivindicación 107, donde la composición comprende una molécula vehículo.

109. El anticuerpo de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177, donde el anticuerpo es un anticuerpo diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos cisteínas libres, donde el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara por medio de un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parenteral por un aminoácido de cisteína libre.

110. El anticuerpo de reivindicación 109 donde una o más aminoácidos de cisteína libres tienen un valor de tio reactividad en el rango de 0,6 a 1,0.

111. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 109, en la que dicho anticuerpo es más reactivo que el anticuerpo parental con un reactivo del tiol.

112. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 109, donde el proceso comprende además determinar la reactividad de tiol del anticuerpo diseñado con cisteína al reaccionar el anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo que reacciona al tiol; donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo que reacciona al tiol.

113. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 109, en el que uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre se encuentran en una cadena ligera.

114. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 109, en la que el anticuerpo es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo diseñado con cisteína que se une covalentemente a un agente citotóxico.

115. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 114, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.

116. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 109, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura, una marca de detección o un soporte sólido.

117. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 116, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura de biotina.

118. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 116, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de un tinte fluorescente.

119. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 118, donde el tinte fluorescente se selecciona a partir de un tipo de fluoresceína, un tipo de rodamina, dansil, lisamina, cianina, ficoeritrina, Rojo Texas y un análogo de éstos.

120. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 116 donde el anticuerpo está unido covalentemente al radionúclido de detección marcado seleccionado de ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, y ^{213}Bi

121. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 116, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección mediante un ligando quelante.

122. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 121, donde el ligando quelante se selecciona a partir de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.

123. El anticuerpo de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177 que comprende un péptido de unión a la albúmina.

124. El anticuerpo de la reivindicación 123, donde el péptido de unión a la albúmina se selecciona a partir de los identificadores de secuencia nos.: 80-84.

125. El anticuerpo de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177 en donde el anticuerpo además comprende un aminoácido de cisteína libre en una o más posiciones seleccionadas a partir de 15, 43, 110, 144, 168 y 205 de la cadena ligera de acuerdo con la convención de la numeración de Kabat y 41, 88, 115, 118, 120, 171, 172, 282, 375 y 400 de la cadena pesada según la convención de numeración EU.

126. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde una cisteína se encuentra en la posición 205 de la cadena ligera.

127. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde una cisteína se encuentra en la posición 118 de la cadena ligera.

128. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde una cisteína se encuentra en la posición 400 de la cadena ligera.

129. El anticuerpo de la reivindicación 125, en la que el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, y un anticuerpo humanizado.

130. El anticuerpo de la reivindicación 125 que es un fragmento de anticuerpo.

131. El anticuerpo de la reivindicación 130, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

132. El anticuerpo de la reclamación 125 en el que es seleccionado a partir de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

133. El anticuerpo de la reivindicación 125 que se produce en una bacteria.

134. El anticuerpo de la reclamación 125 en el que se produce en células CHO.

135. Un método para determinar la presencia de una proteína CD79b en una muestra que se cree que contiene dicha proteína; este método comprende exponer esta muestra a un anticuerpo de la reivindicación 120 y determinar la unión de este anticuerpo a dicha proteína CD79b en esta muestra, donde la unión del anticuerpo a dicha proteína indica la presencia de dicha proteína en la muestra.

136. El método de la reivindicación 135, donde dicha muestra contiene una célula de la cual se sospecha que exprese tal proteína CD79b.

137. El método de la reivindicación 135 donde dicha célula es una célula B.

138. El método de la reivindicación 135, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca seleccionada a partir de un tinte fluorescente, un radioisótopo, una biotina o un ligando de formación de complejos de metal.

139. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD79b de la reivindicación 125 y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

140. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde el anticuerpo se enlaza de manera covalente a una auristatina o a una fracción de fármaco maitansinoide a partir de lo cual se forma un conjugado de fármaco y anticuerpo.

141. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140 comprende un anticuerpo (Ab) y una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide (D) en la que el anticuerpo diseñado con

360

cisteína se une por medio de uno o más aminoácidos sin cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

donde p es 1, 2, 3 ó 4.

142. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141, donde p es 2.

143. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141, donde L tiene la fórmula:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

donde:

A es una unidad de extensión enlazada de manera covalente a un tiol cisteína del anticuerpo (Ab) diseñado con cisteína,

a es 0 ó 1,

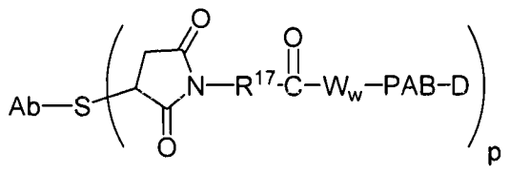
cada W es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es un entero comprendido entre 0 y 12,

Y es una unidad de extención enlazada de manera covalente a la porción de fármaco, e

y es 0, 1 ó 2.

144. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 143 con la fórmula:



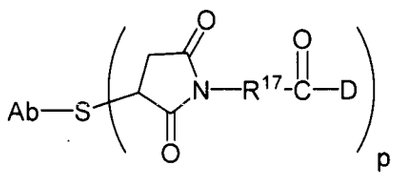
donde PAB es para-aminobencilcarbamoil y R^{17} es un radical divalente seleccionado de $(CH_2)_r$, C_3-C_8 carbociclilo, O–$(CH_2)_r$, arileno, $(CH_2)_r$–arileno, –arileno–$(CH_2)_r$–, $(CH_2)_r$–(C_3-C_8 carbociclilo), (C_3-C_8 carbociclilo)–$(CH_2)_r$, C_3-C_8 heterociclilo, $(CH_2)_r$–(C_3-C_8 heterociclilo), –(C_3-C_8 heterociclilo)–$(CH_2)_r$–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_r$–CH_2–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–, –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–, –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–, y –$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$– ; donde R^b es H, C_1-C_6 alquilo, fenilo o bencilo; y r es independientemente un número entero que varía de 1 a 10.

145. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 142, donde W_w es valina-citrulina.

361

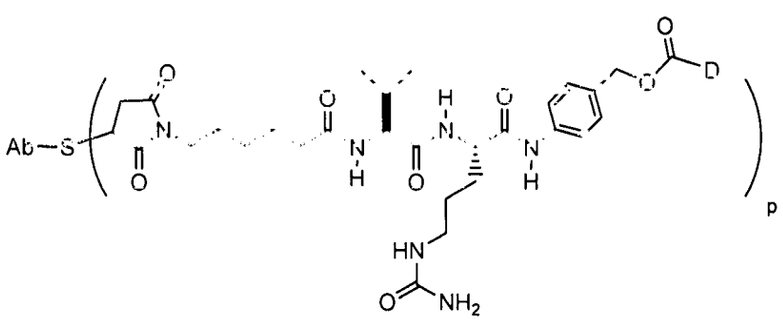
146. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 143, donde R^{17} es $(CH_2)_5$ o $(CH_2)_2$.

147. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 143 con la fórmula:



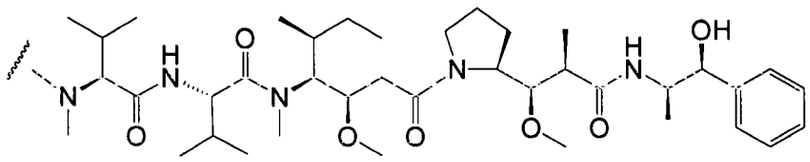
148. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 147, donde R^{17} es $(CH_2)_5$ o $(CH_2)_2$.

149. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 143 con la fórmula:



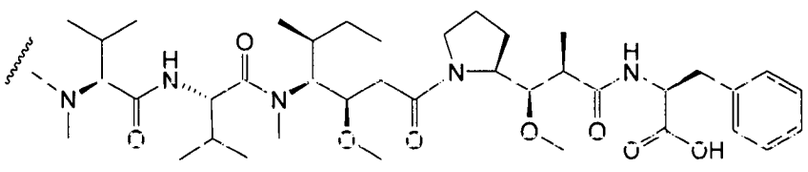
150. El compuesto del conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141 en el que L es SMCC, SPP, SPDB o BMPEO.

151. El compuesto del conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141 en el que D es MMAE, que tiene la estructura:



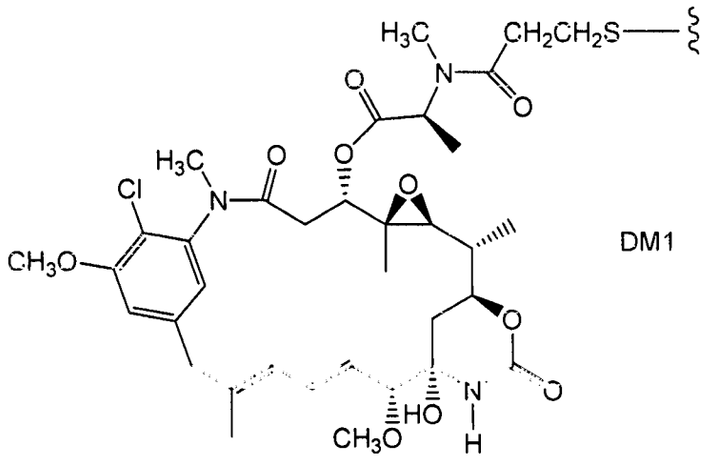
en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

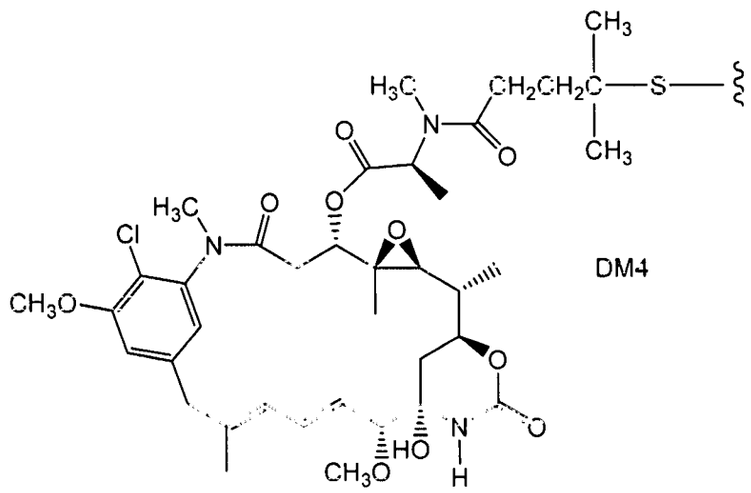
152. El compuesto del conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141 en el que D es MMAE, que tiene la estructura:



en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

153. El compuesto del conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141 en el que D es DM1 o DM4, teniendo las estructuras:



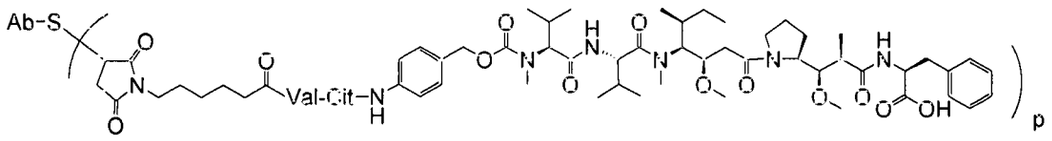


en el que la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

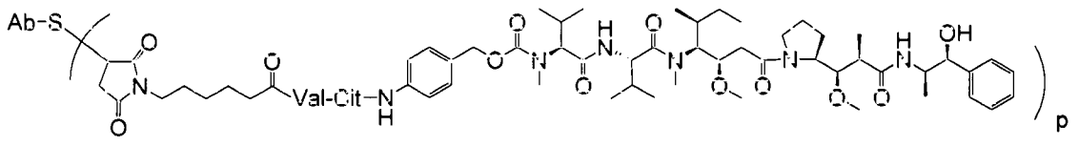
154. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140, donde el anticuerpo se selecciona a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

155. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

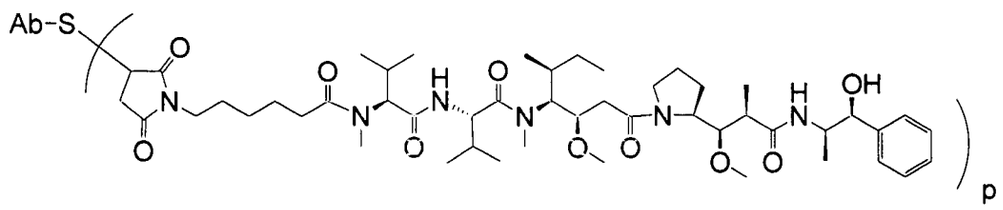
156. El compuesto del conjugado de anticuerpo con fármacos seleccionado de las estructuras:



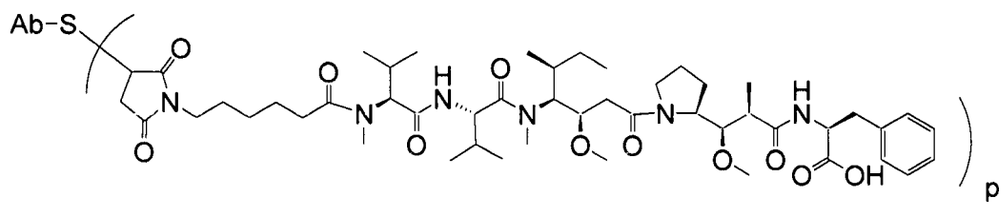
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



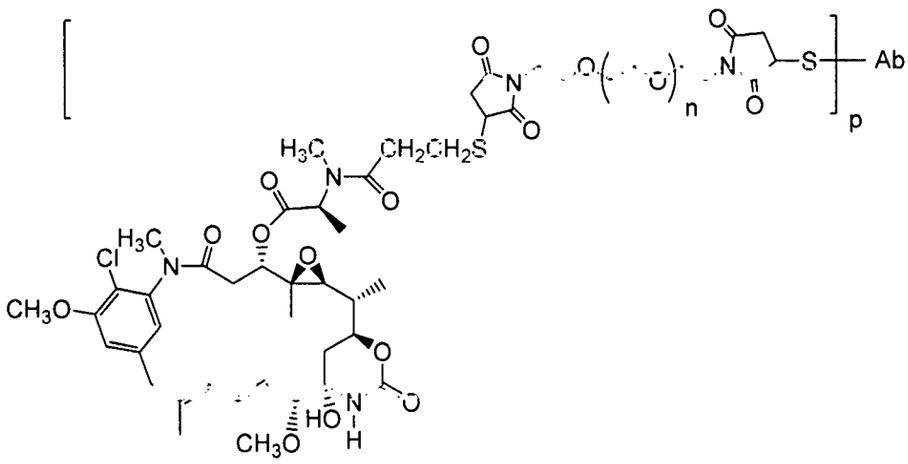
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

donde Val es valina, Cit es citrulina, p es 1, 2, 3 ó 4 y Ab es un anticuerpo de la reivindicación 125.

157. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140, donde la auristatina es MMAE o MMAF.

158. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 141, donde L es MC-val-cit-PAB o MC.

159. Un ensayo para detectar las células B que comprende:

(a) exponer las células a un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140 y

(b) determinar el grado de unión del compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos a las células.

160. Un método para inhibir la proliferación celular que comprende tratar las células B cancerosas de mamíferos en un medio de cultivo celular con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140, donde se inhibe la proliferación de las células B cancerosas.

161. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 140, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

162. Un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un paciente de una formulación farmacéutica de la reivindicación 161.

163. El método de la reivindicación 162, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste de linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

164. El método de la reivindicación 162, donde se administra al paciente un agente citotóxico en combinación con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos.

360

165. Un artículo fabricado que comprende:
la formulación farmacéutica de la reivindicación 160;
un envase contenedor, y
un prospecto o etiqueta donde se indica que el compuesto puede usarse para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido CD79b.

166. El artículo fabricado de la reivindicación 165, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste de linfoma, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

167. Un método para la fabricacipon de un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos que comprende un anticuerpo anti-CD79b (Ab) de la reivindicación 125, y una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide (D) en el que el anticuerpo se une por medio de uno o más aminoácidos diseñados con cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

donde p es 1, 2, 3 ó 4; el método comprende los siguientes pasos:

(a) un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína reacciona con un reactivo enlazador para formar un anticuerpo enlazador intermedio Ab-L, y

(b) Ab-L reacciona con una fracción de fármaco D activada, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos;

o comprende estos pasos:

(c) reacción de un grupo nucleófilo de una porción de fármaco con un reactivo enlazador para formar un intermediario fármaco-enlazador D-L, y

(d) reacción de D-L con un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos.

168. El método de la reivindicación 167 que comprende, además, el paso para expresar el anticuerpo en células de ovario de hámster chino (CHO).

169. El método de la reivindicación 167 que también comprende el paso de tratar el anticuerpo expresado con un agente reductor.

170. El método de la reivindicación 169, donde el agente reductor se selecciona de entre TCEP y DTT.

171. El método de la reivindicación 169 que también comprende el paso de tratar el anticuerpo expresado con un agente oxidante, después de tratarlo con un agente reductor.

172. El método de la reivindicación 171, donde el agente oxidante se selecciona de entre sulfato de cobre, ácido deshidroascórbico y el aire.

173. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 90 ó 85.

174. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 89 y una secuencia de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 85.

175. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 89 ó 88.

176. El anticuerpo de la reivindicación 125, donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 88 y una secuencia de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 90.

177. Un anticuerpo que se une a CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de homología de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 14 y un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de homología de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 10.

178. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 42, 54 ó 177.

179. La composición de la reivindicación 178, donde la composición comprende una molécula vehículo.

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC. y col.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD79B E INMUNOCONJUGADOS HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO

<130> P5112R1

<141> 2007-10-19

<150> US 60/950,088
<151> 2007-07-16

<160> 122

<210> 1
<211> 1270
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50

tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100

aggctggcgt tgtctcctgt gcccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150

gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200

ggaatcccaa aggtagtgct tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250

atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300

cgcctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350

cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400

tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450

ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcggaggtc taccagggct 500

gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550

cagaggaaca cgctgaagga tggtatcatc atgatccaga cgctgctgat 600

catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650

gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700

cagacagcca cctatgagga catagtgacg ctgcggacag gggaagtgaa 750

gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800

tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850

gctcatggcc caaccccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900

gcccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctggtcccc agctcttgcc 950

aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000

ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050

ccccacacat gggatggggg aggcagagac tggtccagag cccgcaaatg 1100

gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150

aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200

tcccacccca gggaggccct ggcctccagt gccttccccc gtggaataaa 1250

cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena ligera

<400> 3
gatatcgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca 50

accagcctcc atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg 100

gaaagacata tttgaattgg ttattacaga ggccaggcca gtctccagag 150

cgcctaattt atctggtgtc taaactggat tctggagtcc ctgacaggtt 200

cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250

aggctgagga tttgggagtt tattgttgct ggcaaggtac acattttccg 300

tacacgttcg gaggggggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 350

accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 400

ctgcttctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa 450

gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag 500

tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc 550

tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 650

agagtgt 657

<210> 4
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena ligera

<400> 4
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Cys Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 5
<211> 1329
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena pesada

<400> 5
caggttcaac tccagcaacc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc 50

agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga 100

tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgaatg gattggtatg 150

attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcatatct tcaaggacaa 200

ggccactttg actgtagaca aatcctccag cacagcctac ttgcagctca 250

gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaaatctc 300

tacttgtggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctccttag cctccaccaa 350

gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg 400

gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 450

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc 500

ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgactg 550

tgccctctag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga 650

caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac 700

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 750

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc 800

tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca 850

agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 900

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg 950

caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1000

aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1050

cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg 1100

cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg 1150

agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa 1250

cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc 1300

agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 1329

<210> 6
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo 2F2 quimérico - Cadena pesada

<400> 6

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

```
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
                230                 235                 240

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

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

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

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                320                 325                 330

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                335                 340                 345

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
                350                 355                 360

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
                365                 370                 375

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                380                 385                 390

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                395                 400                 405

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
                410                 415                 420

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                425                 430                 435

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440
```

<210> 7
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

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

 Lys Ser Glu Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
                35                  40                  45

 Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe
                50                  55                  60

 Thr Val Lys Met His Cys Tyr Val Thr Asn Ser Thr Phe Ser Ile
                65                  70                  75
```

```
Val Ser Trp Leu Arg Lys Arg Glu Thr Asp Lys Glu Pro Gln Gln
                80                  85                  90

Val Asn Leu Glu Gln Gly His Met His Gln Thr Gln Asn Ser Ser
                95                 100                 105

Val Thr Thr Leu Ile Ile Gln Asp Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly
               110                 115                 120

Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Glu Cys Ser Lys Thr Ser Glu Val Tyr
               125                 130                 135

Arg Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu
               140                 145                 150

Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met
               155                 160                 165

Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
               170                 175                 180

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Ala Asp
               185                 190                 195

His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
               200                 205                 210

Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly
               215                 220                 225

Glu His Pro Gly Gln Glu
               230
```

<210> 8
<211> 228
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

```
Met Ala Thr Leu Val Leu Ser Ser Met Pro Cys His Trp Leu Leu
  1               5                  10                  15

Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ser Gly Glu Pro Val Pro Ala Met Thr
               20                  25                  30

Ser Ser Asp Leu Pro Leu Asn Phe Gln Gly Ser Pro Cys Ser Gln
               35                  40                  45

Ile Trp Gln His Pro Arg Phe Ala Ala Lys Lys Arg Ser Ser Met
               50                  55                  60

Val Lys Phe His Cys Tyr Thr Asn His Ser Gly Ala Leu Thr Trp
               65                  70                  75

Phe Arg Lys Arg Gly Ser Gln Gln Pro Gln Glu Leu Val Ser Glu
               80                  85                  90

Glu Gly Arg Ile Val Gln Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu
               95                 100                 105

Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys
              110                 115                 120

Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn His Asn Val Thr Asp Ser Cys
              125                 130                 135
```

Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser Thr Leu Asp Gln Leu
140 145 150

Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Ile Gln Thr
155 160 165

Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu
170 175 180

Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr
185 190 195

Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val
200 205 210

Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
215 220 225

Gly Gln Glu

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser 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
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera del hu2F2 quimérico

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

Gly Gln Ser Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera del injerto de anticuerpo humanizado (Injerto hu2F2)

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de cadena pesada de 2F2 quimérico

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Leu
110

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de cadena pesada de injerto de anticuerpo humanizado (Injerto hu2F2)

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L3 (parcial) de variante de anticuerpo humanizado (Injerto hu2F2)

<400> 17
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de anticuerpo humanizado (mutación HVR-L3)

<400> 18
Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe
5

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FR1 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 19
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

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

<220>
<223> FR2 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 20
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 21

<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FR3 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 21
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

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

Tyr Cys

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FR4 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 22
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR1 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 23
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR2 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 24
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR3 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 25
Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
5

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CL1 - LC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 26
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
95 100 105

Cys

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

<220>
<223> FR1 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

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

<220>
<223> FR2 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 28
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

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

<220>

<223> FR3 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 29
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FR4 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 30
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

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

<220>
<223> HVR1 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 31
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
5 10

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR2 - HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 32
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn His Ile
1 5 10 15

Phe Lys Asp

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR3-HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 33
Ala Arg Asn Leu Tyr Leu
5

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CH1 de HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 34
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105

Thr His Thr

<210> 35
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fc de HC de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 35
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
80 85 90

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
95 100 105

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
110 115 120

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
125 130 135

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
140 145 150

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
155 160 165

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
170 175 180

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
185 190 195

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
200 205 210

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
215 220

<210> 36
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 37
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 38
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 39
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 40
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

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

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 41

<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 42
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 43
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 44
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 45
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 46
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 47
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 48
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 49
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 50
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 51
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 52
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 53
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 54
<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 55
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 56
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 57
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 58
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR1-LC del injerto de hu2F2

<400> 59
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR2-LC del injerto de hu2F2

<400> 60
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR3-LC del injerto de hu2F2

<400> 61
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR1-HC del injerto de hu2F2

<400> 62
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn
5 10

<210> 63
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR2-HC del injerto de hu2F2

<400> 63
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn His Ile
1 5 10 15

Phe Lys Asp

<210> 64
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR3-HC del injerto de 2F2

<400> 64
Ala Arg Asn Leu Tyr Leu
5

<210> 65
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 67
<211> 32
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

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

Tyr Cys

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 69
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FR3-HC Compuesto de variantes de anticuerpos humanizados

<220>
<221> Característica misc
<222> 6
<223> Xaa = A o R

<220>
<221> Característica misc
<222> 8
<223> Xaa =T o N

<220>
<221> Característica misc
<222> 13
<223> Xaa = A o L

<400> 73
Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15

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

<210> 74
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala

<210> 75
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 76
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ser

<210> 77
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

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

Ser Arg

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido con epítopo

<400> 78
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys
1 5 10 15

Lys

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L3 de la variante del anticuerpo humanizado (hu2F2.D7)

<400> 79
Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
5

<210> 80
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la albúmina

<400> 80
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 81
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la albúmina

<400> 81
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 82
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la albúmina

<400> 82
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 83
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la albúmina

<400> 83
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la albúmina

<400> 84
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10
<210> 85
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Thio anti-CD79b (hu2F2.D7)-variante HC(A118C) - HC

<400> 85
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser
110 115 120

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
125 130 135

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
140 145 150

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
155 160 165

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
170 175 180

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
185 190 195

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
200 205 210

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
215 220 225

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
230 235 240

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

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

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

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
320 325 330

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335 340 345

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
350 355 360

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
365 370 375

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
380 385 390

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
395 400 405

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
410 415 420

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
425 430 435

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 86
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Thio anti-CD79b (hu2F2.D7)-variante HC(A118C) - LC

<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 87
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Thio anti-CD79b (hu2F2.D7)-variante LC(V205C) -HC

<400> 87

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

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

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

Glu Trp Val Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn His Ile Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Tyr Leu Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
110 115 120

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
125 130 135

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
140 145 150

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
155 160 165

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
170 175 180

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
185 190 195

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
200 205 210

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
215 220 225

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
230 235 240

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

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

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

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
320 325 330

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335 340 345

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
350 355 360

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
365 370 375

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
380 385 390

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
395 400 405

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
410 415 420

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
425 430 435

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 88
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Thio anti-CD79b(hu2F2.D7)-variante LC(V205C)-LC

<400> 88
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 89
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo hu2F2.D7

<400> 89
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 90
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo hu2F2.D7

<400> 90

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5				10						15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
			20					25						30	
Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
			35					40						45	
Glu	Trp	Val	Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	
			50					55						60	
Asn	His	Ile	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	
			65					70						75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
			80					85						90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Tyr	Leu	Trp	Gly	Gln	
			95					100						105	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			110					115						120	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
			125					130						135	
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
			140					145						150	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
			155					160						165	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
			170					175						180	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
			185					190						195	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
			200					205						210	
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			215					220						225	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
			230					235						240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
			245					250						255	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
			260					265						270	
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280						285	

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
320 325 330

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335 340 345

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
350 355 360

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
365 370 375

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
380 385 390

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
395 400 405

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
410 415 420

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
425 430 435

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 91
Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
5 10

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 92
Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
5 10

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC
<400> 93
Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
5 10

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 94
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 95
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 96
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 97
Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
5 10

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 98
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-HC

<400> 99
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 100
Gln Val Gln Leu Cys Gln Pro Gly Ala Glu
5 10

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 101
Val Lys Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 102
Leu Ser Ser Leu Thr Cys Glu Asp Ser Ala Val
5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 103
Thr Ser Val Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC
<400> 104
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 105
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 106
Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
5 10

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 107
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-HC

<400> 108
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 109
Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
5 10

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 110
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 111
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 112
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 113
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 114
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-hu2F2-LC

<400> 115
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 116
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC

<400> 116
Thr Leu Ser Val Thr Cys Gly Gln Pro Ala Ser
5 10

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

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC

<400> 117
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC

<400> 118
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC

<400> 119
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC

<400> 120
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (ch2F2)-LC
<400> 121

Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de Thio-anti-CD79b (2chF2)-LC

<400> 122
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACC**ATG**GCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCCGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
G**TGA**GAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIGURA 1

411

DNA225786

MAPLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPPGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VFMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIKFEDNGIY
FCQQKCNNTSDVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Secuencia de señal.
aminoácidos 1-28.
Dominio transmembrana.
aminoácidos 5-25, 159-179.
Dominio de inmunoglobulina.
aminoácidos 58-124.
Motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina.
aminoácidos 193-213.
Sitio de N-glicosilación.
aminoácidos 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.
Sitio de fosforilación de proteína quinasa C.
aminoácidos 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.
Sitio de fosforilación de caseína quinasa II.
aminoácidos 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.
Sitio de fosforilación de tirosina quinasa.
aminoácidos 113-120.
Sitio de N-miristoilación.
aminoácidos 40-45, 118-123.

FIGURA 2

412

CADENA LIGERA DE CD79b ANTI-HUMANO QUIMÉRICO (ch2F2)

GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTAT
TACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAGAGCGCCTAATTTATCTGGTGTCTAAACTGGATTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTGTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCG
GAGGGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIGURA 3

CADENA LIGERA DE CD79b ANTI-HUMANO QUIMÉRICO (ch2F2)

DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 4

CADENA PESADA DE CD79b ANTI-HUMANO QUIMÉRICO (ch2F2)

CAGGTTCAACTCCAGCAACCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG
GACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATGATTGATCCTTCGGACAGTGAAACTCACTACAATCAT
ATCTTCAAGGACAAGGCCACTTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACTTGCAGCT
CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAATCTCTACTCGTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTTAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG
GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIGURA 5

CADENA PESADA DE CD79b ANTI-HUMANO QUIMÉRICO (ch2F2)

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIDPSDSETHYNH
IFKDKATLTVDKSSSTAYLQLSSLTSEDSAVYYCARNLYLWGQGTSVTVSLASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

FIGURA 6

Secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL)

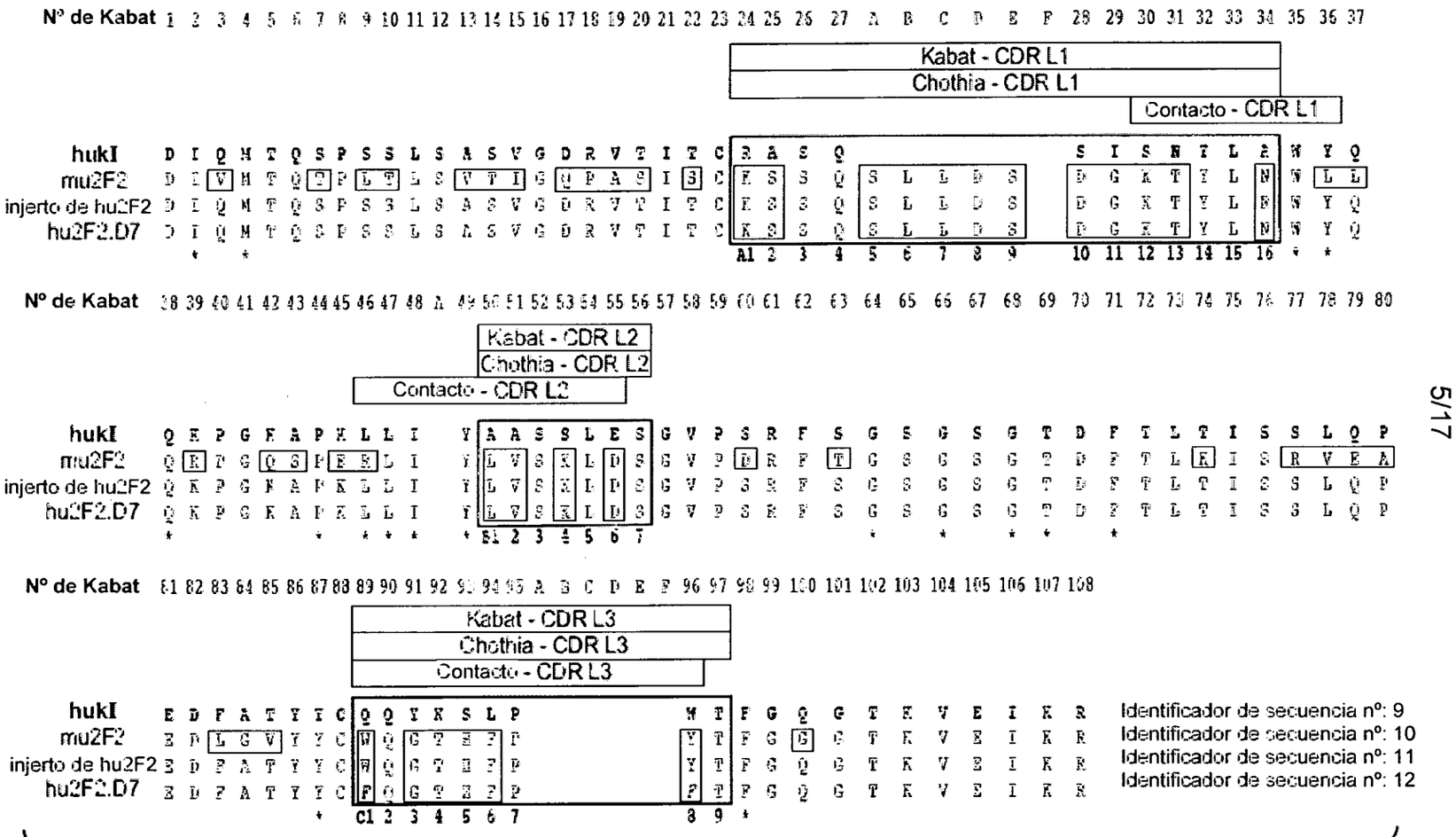
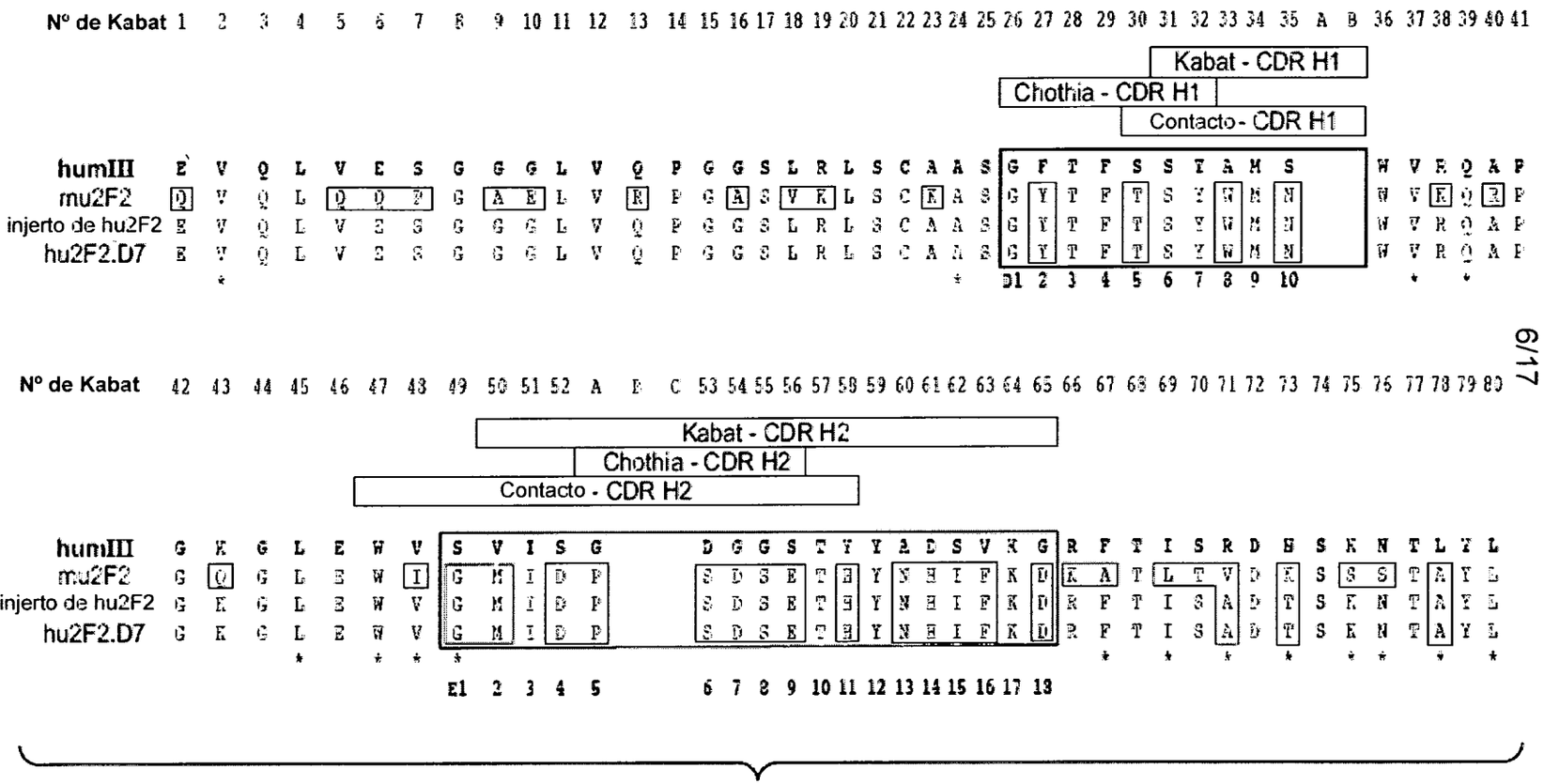


FIGURA 7

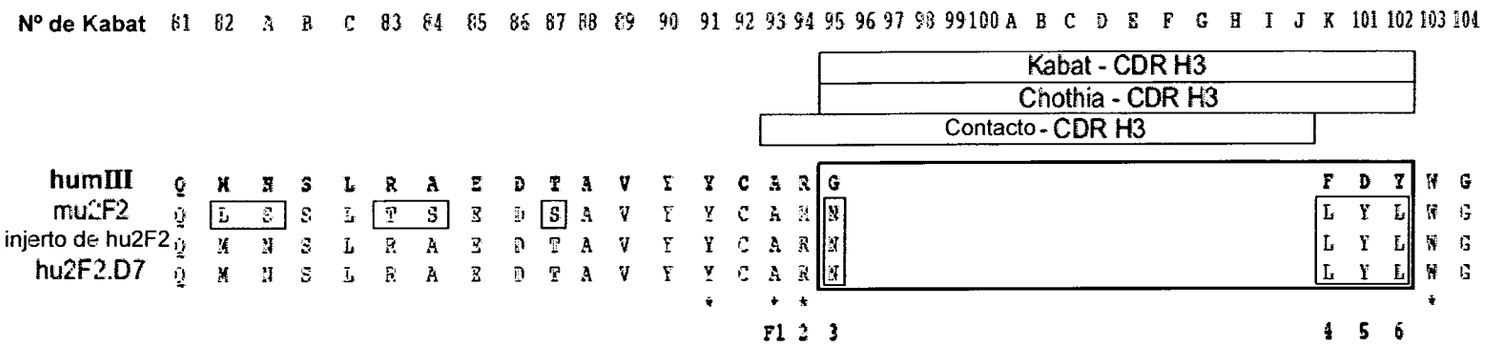
Secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH)



6/17

FIGURA 8A

Secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH)



Identificador de secuencia nº: 13
Identificador de secuencia nº: 14
Identificador de secuencia nº: 15
Identificador de secuencia nº: 16

FIGURA 8B

7/17

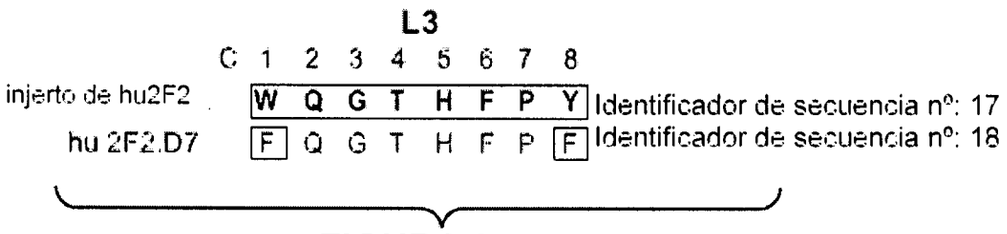


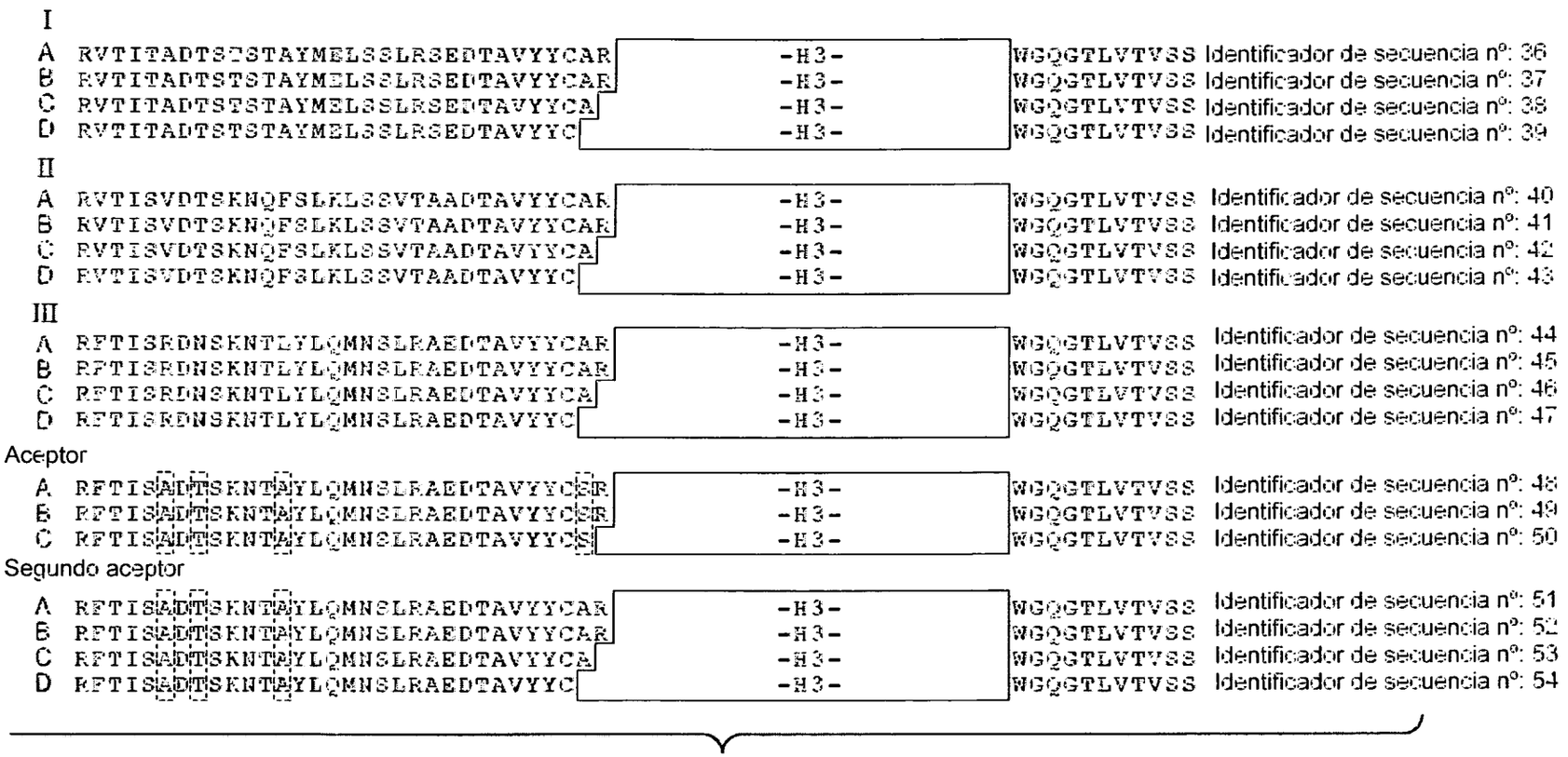
FIGURA 9

	KD Biacore (nM)		
Variante de 2F2	Fab	IgG	Antígeno inmovilizado
ch 2F2	108	2,7	hu CD79b.ecd-Fc
	111	1,4	hu CD79b.ecd
		2	Péptido de 15 unidades
Injerto de hu2F2	NB	NB	hu CD79b.ecd-Fc
		NB	hu CD79b.ecd
hu 2F2.D7	68	3,9	
		2,7	Péptido de 16 unidades

FIGURA 10


I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2-
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2-
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Segundo aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-

FIGURA 11A



10/17

FIGURA 11B

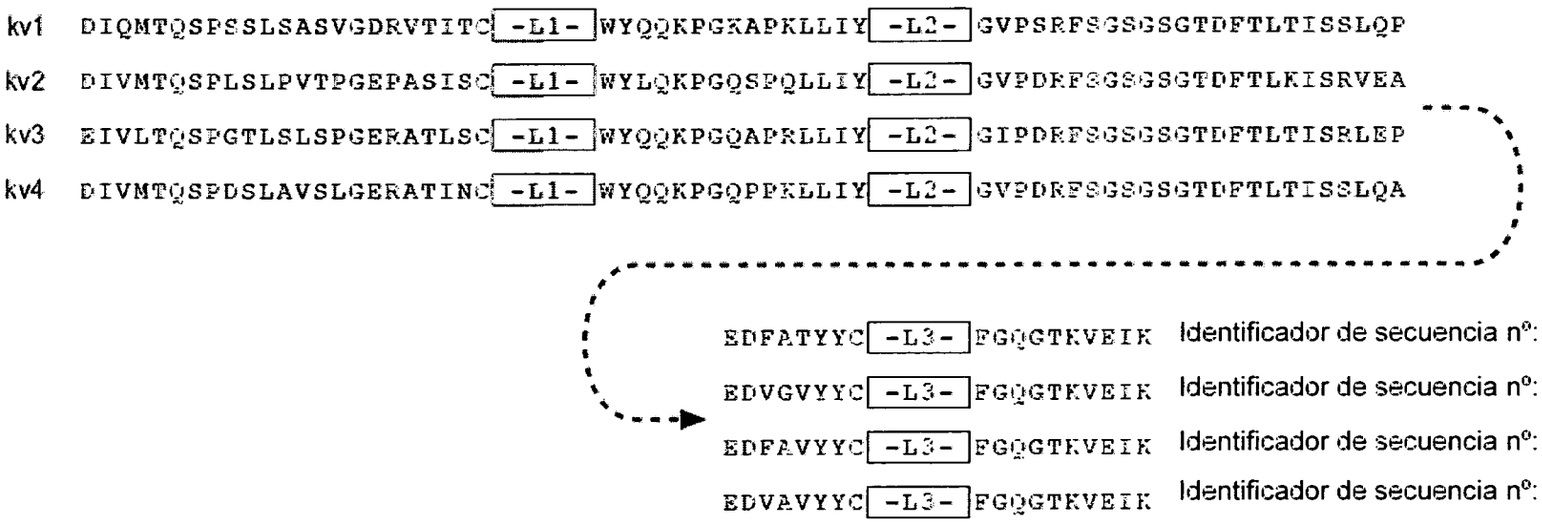


FIGURA 12

42h

A. Cadena ligera de hu2F2.D7

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (Identificador de secuencia nº: 19)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (Identificador de secuencia nº: 20)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (Identificador de secuencia nº: 21)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (Identificador de secuencia nº: 22)
HVR1-LC: KSSQSLLDSDGKTYLN (Identificador de secuencia nº: 23)
HVR2-LC: LVSKLDS (Identificador de secuencia nº: 24)
HVR3-LC: FQGTHFPFT (Identificador de secuencia nº: 25)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(Identificador de secuencia nº: 26)

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Identificador de secuencia nº: 89)

Dominio variable-LC:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKR (Identificador de secuencia nº: 12)

B. Cadena pesada de hu2F2.D7

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (Identificador de secuencia nº: 27)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (Identificador de secuencia nº: 28)
FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (Identificador de secuencia nº: 29)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (Identificador de secuencia nº: 30)
HVR1-HC: GYTFTSYWMN (Identificador de secuencia nº: 31)
HVR2-HC: GMIDPSDSETHYNHIFKD (Identificador de secuencia nº: 32)
HVR3-HC: ARNLYL (Identificador de secuencia nº: 33)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(Identificador de secuencia nº: 34)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(Identificador de secuencia nº: 35)

Cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(Identificador de secuencia nº: 90)

Dominio variable-HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLWGQGTLVTVSS (Identificador de secuencia nº: 16)

FIGURA 13



FIGURA 14

{JLLCCO: 206364.DOC v.1}

423

FIGURA 15

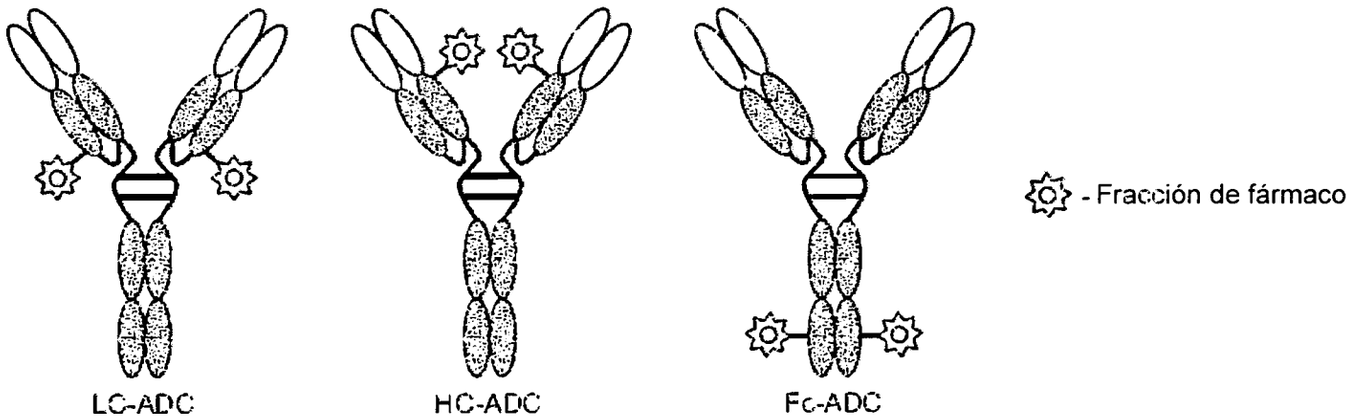
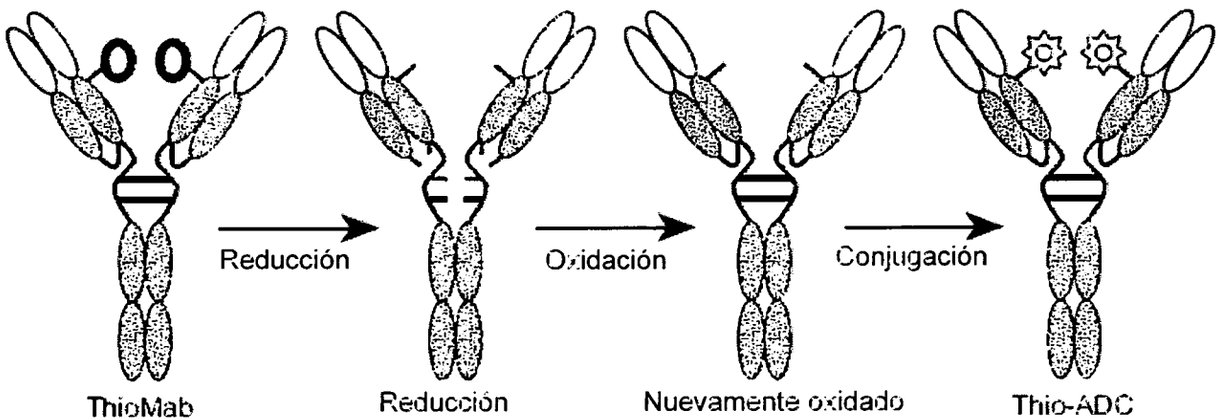


FIGURA 16



924

ThioMAb anti-CD79b A118C hu2F2.D7 con cadena pesada diseñada con cisteína

A. Secuencia de la cadena ligera

Thio-hu2F2.D7-HC-A118C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (Identificador de secuencia nº: 86)

B. Secuencia de la cadena pesada

Thio-hu2F2.D7-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLNGGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(Identificador de secuencia nº: 85)

FIGURA 17

ThioMAb anti-CD79b V205C hu2F2.D7 con cadena ligera diseñada con cisteína

A. Secuencia de la cadena ligera

Thio-hu2F2.D7-LC-V205C (LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLDSDGKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYLVSKLDSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGTHFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (Identificador de secuencia nº: 88)

B. Secuencia de la cadena pesada

Thio-hu2F2.D7-LC-V205C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLEWVGMIDPSDSETHYNHIFK
DRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLYLNGGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(Identificador de secuencia nº: 87)

FIGURA 18

425

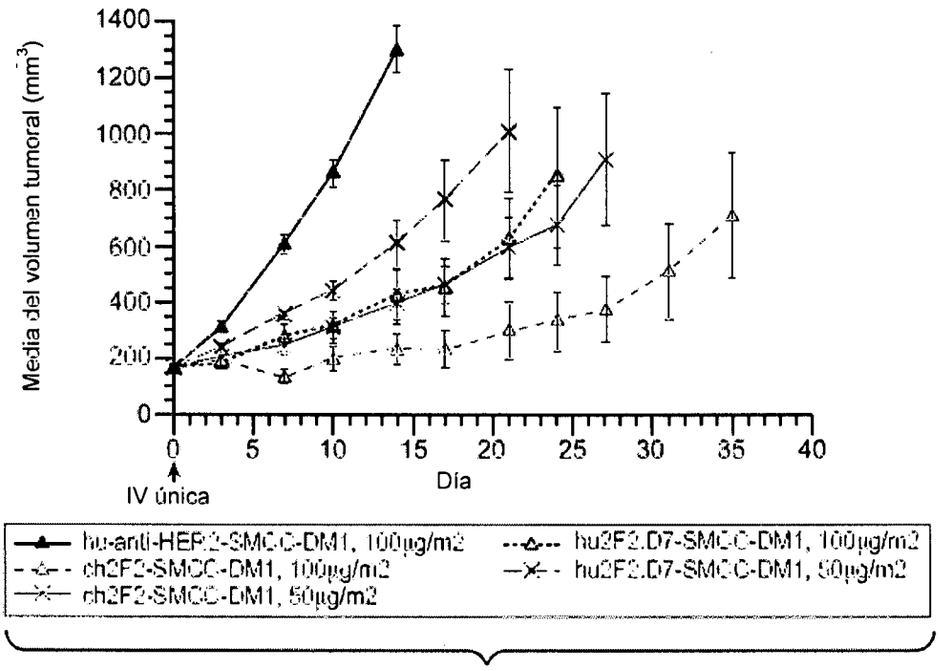

Media del volumen tumoral (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Día
IV única
hu-anti-HER2-SMCC-DM1, 100µg/m2
ch2F2-SMCC-DM1, 100µg/m2
ch2F2-SMCC-DM1, 50µg/m2
hu2F2.D7-SMCC-DM1, 100µg/m2
hu2F2.D7-SMCC-DM1, 50µg/m2

FIGURA 19

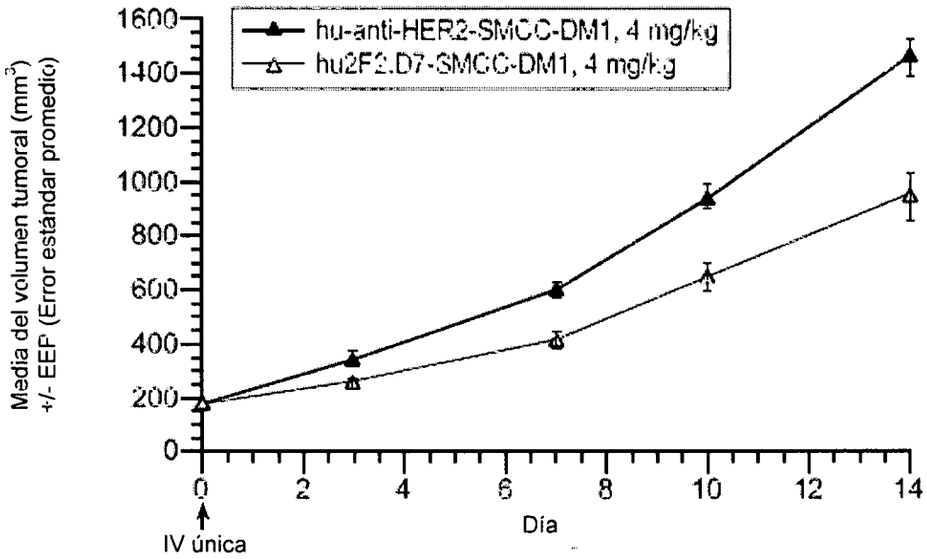


FIGURA 20A

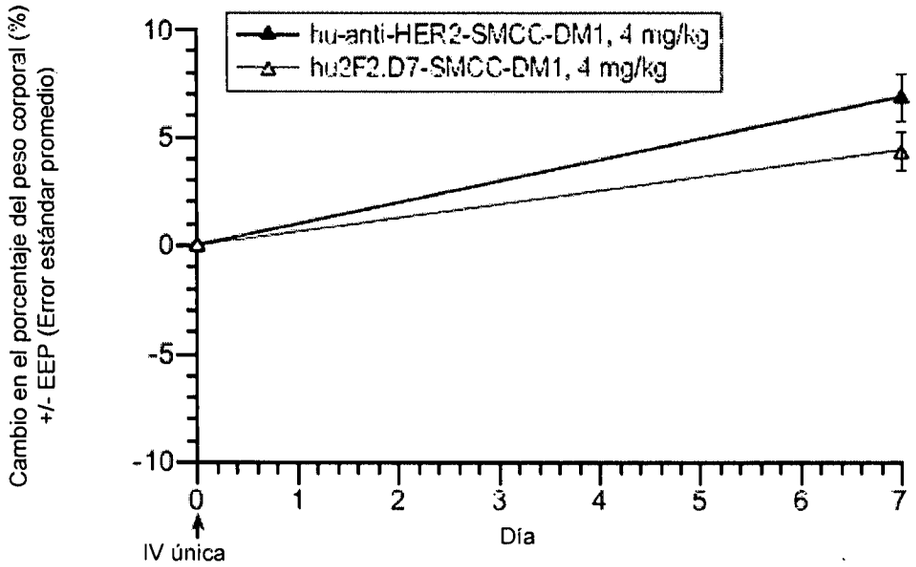


FIGURA 20B

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-009432- -00000-0000

Fecha: 2010-01-29 16:29:37 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 427

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT (1)
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) (91)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes (411)
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento) (3)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

BICENTENARIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 9432
	Solicitud internacional	PCT/US2008/070061
	Fecha inicio fase nacional	16/02/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3031

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal h) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 05 MAR. 2010
adpa11

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 9432
	Solicitud internacional	PCT/US2008/070061
	Fecha inicio fase nacional	16/02/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3032

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única Nº 10 de 2001.

ALIX CARMENCA CRESPES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 05 MAR. 2010
adpall