

ANTICUERPOS ANTI-CD79b Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nro. 62/088487, presentada el 5 de diciembre de 2014, incorporada en esta solicitud por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí en su totalidad a modo de referencia. Dicha copia ASCII, creada el 30 de Noviembre de 2015, se llama P32464_SL.txt y su tamaño es de 43.460 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD79b, que incluyen anticuerpos anti-CD79b que comprenden un dominio de unión CD3 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico dependiente de células T anti-CD79b/CD3 (TDB, conforme a sus siglas en inglés)) y métodos para su uso.

ANTECEDENTES

Los trastornos proliferativos celulares, tales como el cáncer, se caracterizan por el descontrolado crecimiento de subpoblaciones celulares. Son la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo, con más de 12 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados, y 7 millones de muertes por cáncer por año. El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (National Cancer Institute) estima que más de medio millón de norteamericanos morirán de cáncer en 2013, lo que representa casi una de cada cuatro muertes en el país. A medida que la población anciana crece, la incidencia de cáncer se eleva en forma concurrente, ya que la

probabilidad de desarrollar cáncer es más de dos veces más alta después de los setenta años de edad. El cáncer, por lo tanto, representa una carga social significativa y en continuo aumento.

CD79b es el componente de señalización del receptor de células B, y actúa como un heterodímero covalente que contiene CD79a (es decir, Ig α o mb-1) y CD79b (es decir, Ig β o B29). CD79b contiene un dominio de inmunoglobulina (Ig) extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización intracelular, un dominio de motivo de activación a base de tirosina de inmunorreceptor (ITAM). Usando la citometría de flujo, se ha detectado la expresión de superficie de CD79b en casi todos los pacientes de linfoma no hodgkiniano (NHL, conforme a sus siglas en inglés) y de leucemia linfocítica crónica (CLL, conforme a sus siglas en inglés). Dornan et al., *Blood* 114 (13): 2721–9 (2009). Además de sus funciones de señalización, cuando el receptor de células B es entrecruzado, se dirige al compartimiento del complejo de histocompatibilidad mayor clase II, un compartimiento de tipo lisosoma, como parte de la presentación de antígeno clase II por células B.

Este rasgo de la biología de CD79b lo hace un blanco particularmente atractivo para el uso de ADC, ya que los anticuerpos contra CD79b son internalizados y liberados en estos compartimientos lisosomales, que se sabe contienen proteasa que puede liberar el fármaco citotóxico. Por lo tanto, se han generado conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, conforme a sus siglas en inglés) (tales como el anticuerpo humanizado anti-CD79b (SN8 humanizado) conjugado con monometilauristatina E (MMAE) por un conector disociable de proteasa), que han demostrado ser clínicamente eficaces para el tratamiento de NHL. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 8.088.378 y Morschhauser et al., “4457 Updated Results of a Phase II Randomized Study (ROMULUS) of Polatuzumab Vedotin or Pinatuzumab Vedotin Plus Rituximab in

Patients with Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma” 56th ASH Annual Meeting and Exposition: December 6–9, 2014. A pesar de los avances en el tratamiento de NHL y CLL usando agentes terapéuticos de ADC anti-CD79b, aún continúa habiendo una necesidad no satisfecha de buscar terapias mejoradas para pacientes de NHL y CLL, en particular, aquellos resistentes a las terapias de ADC anti-CD79b.

Recientemente, se han desarrollado inmunoterapias a base de anticuerpos biespecíficos, que son capaces de unión simultánea de antígenos de superficie celular en células citotóxicas y células tumorales, con la intención de que la célula citotóxica ligada destruya la célula tumoral ligada. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden tener ventajas, por ejemplo, eficacia y/o seguridad, en comparación con el conjugado de anticuerpo-fármaco. Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha en el campo, de desarrollar anticuerpos biespecíficos eficaces para el uso en el tratamiento de cáncer.

SÍNTESIS

La invención provee anticuerpos anti-CD79b y métodos para su uso. En particular, se proporcionan en la presente solicitud anticuerpos anti-CD79b que comprenden un dominio de unión CD79b y un dominio de unión CD3.

En un aspecto, se proporcionan en la presente solicitud anticuerpos anti-CD79b aislados, donde el anticuerpo comprende un dominio de unión CD79b que comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR, conforme a sus siglas en inglés): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 11; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En algunas formas de realización, el dominio de unión CD79b comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, 21, 23, 25, 27 o 29; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 22, 24, 26, 28, o 30; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas formas de realización, el anti-CD79b comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 17, 21, 23, 25, 27 o 29. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 18, 22, 24, 26, 28, o 30.

En algunas formas de realización, el dominio de unión CD79b comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, el

anticuerpo anti-CD79b comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 19. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 20.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el dominio de unión CD79b se une a SEQ ID NO: 63.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano con un valor K_D inferior a alrededor de 25 nM como un anticuerpo IgG bivalente, de rama dual, por ejemplo, menos de alrededor de cualquiera de 10 nM o 5 nM. En algunas formas de realización, el K_D es determinado por BIACORE. En algunas formas de realización, el K_D es determinado por CD79b inmovilizado a baja densidad. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a una célula B (por ejemplo, célula BJAB) con un valor EC_{50} de menos de alrededor de 150 ng/ml como un anticuerpo IgG bivalente, de rama dual, por ejemplo, menos de alrededor de cualquiera de 100 ng/ml, 75 ng/ml, o 50 ng/ml. En algunas formas de realización, la unión a una célula B es determinada por FACS (clasificación celular activada por fluorescencia, conforme a sus siglas en inglés). En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano, y se une a una célula B (por ejemplo, célula BJAB) con un valor EC_{50} de menos de

alrededor de 1.5 ug/ml en un formato monovalente (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD79b que comprende un CD79b y dominio de unión CD3), por ejemplo, menos de alrededor de 1 ug/ml, 0.75 ug/ml, 0.5 ug/ml o 0.25 ug/ml. En algunas formas de realización, la unión a una célula B es determinada por FACS.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, o quimérico. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a CD79b. En algunas formas de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, y/o (Fab')₂. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b comprende una mutación de sitio de aglicosilación. En algunas formas de realización, la mutación de sitio de aglicosilación es una mutación de sustitución.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b comprende reducida función efectora. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una mutación de sustitución que se encuentra en el residuo de aminoácido N297, L234, L235, y/o D265 de acuerdo con la numeración EU. En algunas formas de realización, la mutación de sustitución se selecciona del grupo que consiste en N297G, N297A, L234A, L235A y D265A de acuerdo con la numeración EU. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una mutación de sustitución N297G en el residuo de aminoácido 297 de acuerdo con la numeración EU.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo monoespecífico (por ejemplo, anticuerpo bivalente, de rama dual).

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo multiespecífico.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión CD3. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une a un polipéptido CD3 humano o un polipéptido CD3 de macaco (cino). En algunas formas de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 cino es un polipéptido humano CD3 ϵ o un polipéptido CD3 ϵ cino, respectivamente. En algunas formas de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 cino es un polipéptido humano CD3 γ o un polipéptido cino CD3 γ , respectivamente.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3 ϵ con un valor Kd de 250 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3 ϵ con un valor Kd de 100 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al por ejemplo humano CD3 ϵ con un valor Kd de 15 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3 ϵ con un valor Kd de 10 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3 ϵ con un valor Kd de 5 nM o inferior.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el dominio de unión CD3 comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 46; (c) una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (d) una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (e) una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y (f) una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti–CD79b, el dominio de unión CD3 comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 59. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 60.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti–CD79b, el dominio de unión CD3 comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (b) una HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (c) una HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; (d) una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (e) una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; y (f) una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti–CD79b, el dominio de unión CD3 comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 57. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 58.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el dominio de unión CD3 comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el dominio de unión CD3 comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 61. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende una secuencia VL de SEQ ID NO: 62.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de muerte de células B EC_{50} de menos de alrededor de 100 ng/ml, por ejemplo, menos de alrededor de cualquiera de 50, 25, 20, o 15 ng/ml. En algunas formas de

realización, la muerte de células B es muerte de célula B endógena. En algunas formas de realización, la muerte de células B es muerte de célula B de estirpe celular, por ejemplo, estirpe celular BJAB, estirpe celular WSU-CLCL2, estirpe celular OCI-Ly-19. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de activación de células T citotóxicas EC_{50} de menos de alrededor de cualquiera de 50 ng/ml, por ejemplo, menos de alrededor de cualquiera de 25 ng/ml o 20 ng/ml. En algunas formas de realización, la activación de células T citotóxicas es medida por el % de células T CD69+CD25+ en células T CD8+.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, (a) el dominio de unión CD3 comprende un dominio Fc, donde el dominio Fc comprende las mutaciones de sustitución T366S, L368A, Y407V y N297G de acuerdo con la numeración EU y (b) el dominio de unión CD79b comprende un dominio Fc, donde el dominio Fc comprende las mutaciones de sustitución T366W y N297G de acuerdo con la numeración EU. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, (a) el dominio de unión CD79b comprende un dominio Fc, donde el dominio Fc comprende las mutaciones de sustitución T366S, L368A, Y407V y N297G de acuerdo con la numeración EU y (b) el dominio de unión CD3 comprende un dominio Fc, donde el dominio Fc comprende las mutaciones de sustitución T366W y N297G de acuerdo con la numeración EU.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada, donde uno o más dominios constantes

de cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH1₁), un primer dominio CH2 (CH2₁), un primer dominio CH3 (CH3₁), un segundo dominio CH1 (CH1₂), segundo dominio CH2 (CH2₂) y un segundo dominio CH3 (CH3₂). En algunas formas de realización, por lo menos uno de los uno o más dominios constantes de cadena pesada está emparejado con otro dominio constante de cadena pesada. En algunas formas de realización, los dominios CH3₁ y CH3₂ comprenden, independientemente, una protuberancia o cavidad, y donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH3₁ es posicionable en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH3₂. En algunas formas de realización, los dominios CH3₁ y CH3₂ se encuentran en una interfaz entre dichas protuberancia y cavidad. En algunas formas de realización, los dominios CH2₁ y CH2₂ comprenden, independientemente, una protuberancia o cavidad, y donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH2₁ es posicionable en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH2₂. En algunas formas de realización, los dominios CH2₁ y CH2₂ se encuentran en una interfaz entre dichas protuberancia y cavidad.

Se proporcionan además en esta solicitud ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud. Se proporcionan, adicionalmente, vectores que comprenden un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud. Se proporcionan en esta solicitud células huéspedes que comprenden un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula huésped eucariota. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula huésped mamífera (por ejemplo, CHO). En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula huésped procariota. En algunas formas de realización, la célula huésped procariota es una célula huésped de *E. coli*. Se

proporcionan en esta solicitud adicionalmente métodos de producción del anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud, donde el método comprende el cultivo de la célula huésped descrita en esta solicitud en un medio de cultivo.

Se proporcionan adicionalmente en la presente solicitud inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud y un agente citotóxico.

Se proporcionan en la presente solicitud composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud.

Se proporcionan en la presente solicitud anticuerpos anti-CD79b como son descritos en esta solicitud para el uso como un medicamento. Se proporcionan en la presente solicitud anticuerpos anti-CD79b descritos en esta solicitud para el uso en el tratamiento o la demora del avance de un trastorno proliferativo de células B o un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita. Se proporcionan en la presente solicitud anticuerpos anti-CD79b como son descritos en esta solicitud para el uso en el aumento de la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo de células B o un trastorno autoinmunitario. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un cáncer. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL, conforme a sus siglas en inglés), y/o linfoma de células de manto. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo anti-CD79b MMAE fármaco). En algunas formas de realización, el

trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (SLE, conforme a sus siglas en inglés), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, conforme a sus siglas en inglés), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, conforme a sus siglas en inglés), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, soriasis, nefropatía IgA , polineuropatías IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes sacarina, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO, conforme a sus siglas en inglés) y neuropatía IgG.

Se proporcionan en la presente solicitud usos de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b descritos en esta solicitud en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la demora del avance de un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario. Se proporcionan en la presente solicitud usos de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b descritos en esta solicitud en la elaboración de un medicamento para el aumento de la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un cáncer. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y/o linfoma de células de manto. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo anti-CD79b MMAE fármaco). En algunas formas de realización, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que

consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, soriasis, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes sacarina, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía IgG.

Se proporcionan en la presente solicitud métodos de tratamiento o demora del avance de un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita, donde el método comprende la administración, al sujeto, de un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud. Se proporcionan en la presente solicitud métodos para el aumento de la función inmunitaria en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario, donde el método comprende la administración, al sujeto, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD79b descrito en esta solicitud. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un cáncer. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y/o linfoma de células de manto. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo anti-CD79b MMAE fármaco). En algunas formas de realización, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Wegener,

enfermedad intestinal inflamatoria, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), trombocitopenia autoinmunitaria, esclerosis múltiple, soriasis, nefropatía IgA , polineuropatías IgM, miastenia grave, vasculitis, diabetes sacarina, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, glomerulonefritis, neuromielitis óptica (NMO) y neuropatía IgG.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el anticuerpo anti-CD79b se une a (a) una molécula CD3 ubicada en una célula efectora inmunitaria y (b) una molécula CD79b ubicada en una célula B. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b activa la célula efectora inmunitaria luego de la unión a (a) y (b). En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la célula efectora inmunitaria activada es capaz de ejercer un efecto citotóxico y/o un efecto apoptótico sobre la célula blanco.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el método adicionalmente comprende la administración, al sujeto, de un antagonista de unión del eje PD-1 o un agente terapéutico adicional. En algunas formas de realización, el antagonista de unión del eje PD-1 es un antagonista de unión de PD-1. En algunas formas de realización, el antagonista de unión del eje PD-1 es un antagonista de unión de PD-L1. En algunas formas de realización, el antagonista de unión del eje PD-1 es un antagonista de unión de PD-L2.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el método adicionalmente comprende la administración, al sujeto, de un glucocorticoide. En algunas formas de realización, el glucocorticoide es dexametasona.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el método adicionalmente comprende la administración, al sujeto, de rituximab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A–C** muestra la muerte de célula B endógena con anticuerpos anti-CD79b/CD3 TDB (sigla en inglés de: biespecíficos dependientes de células

T) producidos o bien en formato K&H o como bisfabs (diversos clones anti-CD79b emparejados con clon anti-CD3 UCHT1v9). Se incubaron 200.000 PBMC (células mononucleares de sangre periférica, conforme a sus siglas en inglés) con o sin TDB anti-CD79b durante 24 h. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19+/PI-. Se calculó el porcentaje de muerte de células B de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$.

La **Figura 2A–D** muestra la muerte de células B y la actividad de activación de células T de bisfab anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7/UCHT1v9). **A** y **B**: Se incubaron 200.000 PBMC con o sin TDB anti-CD79b durante 24 h. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19+/PI-. El porcentaje de muerte de células B (**A**) se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$; la activación de células T (**B**) se midió mediante la entrada en células CD69+/CD25+ en la población de células CD8+ T. **C** y **D**: se incubaron 20.000 células BJAB y 100.000 células CD8+T con o sin TDB anti-CD79b durante 24 h. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19+/PI-. El porcentaje de muerte de células B (**C**) se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$; la activación de células T (**D**) se midió mediante la entrada en células CD69+/CD25+ en la población de células CD8+ T.

La **Figura 3A–C** muestra la afinidad de unión monovalente o bivalente de diversos clones de anti-CD79b medida por FACS. Se incubaron células BJAB con anticuerpo anti-CD79b (anticuerpo bivalente, de rama dual) o anticuerpo TDB

anti-CD79b/CD3 según lo indicado, durante 30 minutos en hielo. Al final de la incubación, las células se lavaron con regulador helado de FACS (1x PBS (solución salina regulada con fosfato, conforme a sus siglas en inglés), 2% BSA, 2 mM EDTA (ácido etilendiamina tetraacético, conforme a sus siglas en inglés)), seguido de la incubación con anticuerpo IgG antihumano de ratón marcado con PE (BD bioscience #555787). El análisis de citometría de flujo se realizó en un instrumento de análisis BD LSR. La unión de anticuerpo se expresó como intensidad de fluorescencia media (MFI, conforme a sus siglas en inglés) de fluoróforo PE. **A:** La afinidad de unión bivalente del clon anti-CD79b 2F2 en comparación con la afinidad de unión monovalente de clones anti-CD79b 2F2, SN8v28 y SN8new (como TDB K&H); **B:** la afinidad de unión bivalente de clones anti-CD79b CD79b.F6 y CD79b.A7 en comparación con la unión monovalente de clones anti-CD79b CD79b.F6, CD79b.A7 y SN8v28 (como bisfab o TDB K&H); **C:** la afinidad de unión bivalente del clon anti-CD79b CD79b.A7.v14 en comparación con la unión monovalente del clon anti-CD79b CD79b.A7.v14 (como TDB K&H).

La **Figura 4A–B** muestra la alineación de **(A)** región variable de cadena pesada (SEQ ID NOS 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 and 29, respectivamente, en orden de aparición) y **(B)** región variable de cadena liviana de variantes (SEQ ID NOS 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 and 30, respectivamente, en orden de aparición) de anticuerpo CD79b.

La **Figura 5A–B** muestra la muerte de células B y la actividad de activación de células T de TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14 emparejado o bien con el clon anti-CD3 40G5c o 38E4v1). Se incubaron 200.000 PBMC con o sin TDB anti-CD79b durante 48 h. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19+/PI–. El porcentaje de muerte de células B **(A)** se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB})$

* 100; la activación de células T (**B**) se midió mediante la entrada en la población de células CD69⁺/CD25⁺ en la población de células CD8⁺ T.

La **Figura 6A–B** muestra la muerte de células B y la actividad de activación de células T de TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7v14/38E4v1). Se incubaron 20.000 células BJAB o WSU-DLCL2 y 100.000 células CD8⁺T con o sin TDB anti-CD79b durante 48 h. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19⁺/PI⁻. El porcentaje de muerte de células B (**A**) se calculó de la siguiente manera: (número de células B vivas sin TDB – número de células B vivas con TDB) / (número de células B vivas sin TDB) * 100; la activación de células T (**B**) se midió mediante la entrada en células CD69⁺/CD25⁺ en la población de células CD8⁺ T.

La **Figura 7A–C** muestra la actividad de muerte de células B de anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (A7.v14b/38E4v1). Se incubaron 20.000 células de linfoma B (según lo indicado) y 100.000 células CD8⁺T con o sin TDB anti-CD79b durante 48 horas. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19⁺/PI⁻. El porcentaje de muerte de células B se calculó de la siguiente manera: (número de células B vivas sin TDB – número de células B vivas con TDB) / (número de células B vivas sin TDB) * 100. **A.** muestra una curva de dosis y respuesta de la muerte de células B para células BJAB, WSU-DLCL2 y OCI-LY-19, con las células HT como control negativo CD79b; **B–C.** muestran la muerte de células B con 5000 ng/ml TDB anti-CD79 (duplicado, promedio ± STD).

La **Figura 8A–B** muestra la actividad de muerte de células B de anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) *in vitro* e *in vivo*. Las variantes de células BJAB (BJAB-CD79b ADC-R T1.1 y BJAB-SN8v28vcE CD79b ADC-R T1.2) se derivaron de tumores de xenoinjerto BJAB resistentes en ratones tratados con anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE. **A.** Muestra la curva de dosis y

respuesta de la muerte de células BJAB *in vitro*: se incubaron 20.000 células BJAB o variantes de BJAB (según lo indicado) y 100.000 células CD8+T con o sin anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) durante 48 horas. Al final de la incubación, se contó el número de células B vivas mediante la entrada en la población CD19+/PI-. El porcentaje de muerte de células B se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$; **B.** El anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) evita el crecimiento tumoral BJAB *in vivo*: las células BJAB y PBMC de donante sano se mezclaron y se inocularon por vía subcutánea, y los ratones luego se trataron según lo indicado. Los volúmenes tumorales se midieron a lo largo de todo el estudio, hasta 42 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES.

El término “CD79b”, de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a cualquier CD79b nativo de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos, macaco (cino)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. CD79b humano es también referido en esta solicitud como “Igβ,” “B29,” “DNA225786” o “PRO36249.” Un ejemplo de secuencia CD79b que incluye la secuencia de señal se muestra en SEQ ID NO: 1. Un ejemplo de secuencia CD79b sin la secuencia de señal se muestra en SEQ ID NO: 2. El término “CD79b” abarca CD79b “de longitud completa”, no procesado, al igual que cualquier forma de CD79b que resulte del procesamiento en la célula. El término además abarca variantes naturales de CD79b, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos CD79b descritos en esta solicitud puede ser aislados de una diversidad de fuentes, tales como tipos de tejido humano u otra fuente, o pueden

prepararse por métodos de recombinación o de síntesis. Un “polipéptido CD79b de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido CD79b derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos CD79b de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza, o pueden producirse por medios de recombinación o de síntesis. El término “polipéptido CD79b de secuencia nativa” abarca específicamente formas naturales truncadas o secretadas del polipéptido CD79b específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativamente empalmadas) y variantes alélicas naturales del polipéptido.

El término “racimo de diferenciación 3” o “CD3,” de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a cualquier CD3 nativo de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario, incluyendo, por ejemplo, cadenas CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 α y CD3 β . El término contempla CD3 “de longitud completa” no procesado (por ejemplo, CD3 ϵ o CD3 γ no procesado o no modificado), al igual que cualquier forma de CD3 que resulte del procesamiento en la célula. El término además contempla variantes naturales de CD3, que incluyen, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. CD3 incluye, por ejemplo, proteína humana CD3 ϵ (NCBI RefSeq No. NP_000724), que tiene 207 aminoácidos de longitud, y proteína humana CD3 γ (NCBI RefSeq No. NP_000064), que tiene 182 aminoácidos de longitud.

Los términos “anticuerpo anti-CD79b” y “un anticuerpo que se une a CD79b” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unión a CD79b con suficiente afinidad, de modo tal que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento a CD79b. En una forma de realización, el alcance de unión de un anticuerpo anti-CD79b a una proteína no relacionada, no

CD79b, es menos de alrededor de 10% de la unión del anticuerpo a CD79b, medido, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA, conforme a sus siglas en inglés). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a CD79b tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD79b se une a un epítipo de CD79b que es conservado entre CD79b de diferentes especies.

Los términos “anticuerpo anti-CD3” y “un anticuerpo que se une a CD3” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unión a CD3 con suficiente afinidad de manera tal que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento a CD3. En una forma de realización, el alcance de unión de un anticuerpo anti-CD3 a una proteína no relacionada, no CD3, es menos de alrededor de 10% de la unión del anticuerpo a CD3, medido, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a CD3 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD3 se une a un epítipo de CD3 que es conservado entre CD3 de diferentes especies.

El término "anticuerpo" en esta solicitud se usa en su sentido más amplio, y contempla diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad de unión de antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se

une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

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

Un anticuerpo “aislado” es aquel que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas formas de realización, un anticuerpo es purificado a más del 95% o 99% de pureza, según lo determinado, por ejemplo, por técnicas electroforéticas (por ejemplo, SDS-PAGE (electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, conforme a sus siglas en inglés), focalización isoelectrica (IEF, conforme a sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatográficas (por ejemplo, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento conforme a sus siglas en inglés) de intercambio iónico o de fase inversa). Para una reseña de métodos de evaluación de la pureza de anticuerpo, ver, por ejemplo, la referencia de Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848: 79–87 (2007).

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se usan en esta solicitud de modo indistinto, para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una

estructura de anticuerpo nativo, o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en esta solicitud.

El término "anticuerpo monoclonal ", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, donde dichas variantes generalmente se presentan en cantidades menores. En contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como la necesidad de la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales por ser usados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por una diversidad de técnicas, que incluyen, sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinado, métodos de exhibición de fagos, y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci (lugares) de inmunoglobulina humana, donde dichos métodos y otros métodos ejemplares para la preparación de anticuerpos monoclonales son descriptos en esta solicitud.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humana y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y

típicamente, dos, dominios variables, donde la totalidad o sustancialmente la totalidad de las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FR corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, *por ejemplo*, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha pasado por la humanización.

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

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana, o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificadoras de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión de antígeno no humanos.

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

"Anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos nativos IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltones, compuestas de dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. Del término N al C, cada cadena pesada tiene una región

variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, del término N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada un dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido de un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede ser asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena liviana o pesada de anticuerpo que está involucrado en la unión del anticuerpo a antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, donde cada dominio comprende cuatro regiones de marco (FR, conforme a sus siglas en inglés) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR, conforme a sus siglas en inglés) (ver, por ejemplo, la referencia de Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., p. 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión de antígeno. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a un particular antígeno pueden ser aislados usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno a fin de someter a la detección sistemática una genoteca de dominios complementarios VL o VH, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150: 880–887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352: 624–628 (1991).

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

El término “región hipervariable” o “HVR” de acuerdo con la presente solicitud se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia (“regiones determinantes de complementariedad” o “CDR, conforme a sus siglas en inglés”) y/o forman anillas estructuralmente definidas (“anillas hipervariables”) y/o contienen los residuos de contacto de antígeno (“contactos de antígeno”). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Ejemplos de HVR en esta solicitud incluyen:

(a) anillas hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987));

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24–34 (L1), 50–56 (L2), 89–97 (L3), 31–35b (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c–36 (L1), 46–55 (L2), 89–96 (L3), 30–35b (H1), 47–58 (H2), y 93–101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732–745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b), y/o (c), que incluyen residuos de aminoácidos de HVR 46–56 (L2), 47–56 (L2), 48–56 (L2), 49–56 (L2), 26–35 (H1), 26–35b (H1), 49–65 (H2), 93–102 (H3) y 94–102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos FR) son numerados en esta solicitud de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

El término “región Fc” en esta solicitud se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencias

nativas y regiones Fc variantes. En una forma de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el término carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en esta solicitud, la numeración de residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado el índice EU, como se describe en la referencia de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, preferentemente, una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa, o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en esta solicitud preferentemente poseerá por lo menos alrededor de 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente, por lo menos alrededor de 90% de homología con esta, más preferentemente, por lo menos alrededor de 95% de homología con esta.

Un “marco de consenso humano” es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco VH o VL de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable.

Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como se describe en la referencia de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242*, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una forma de realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en la referencia de Kabat *et al.*, *supra*. En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en la referencia de Kabat *et al.*, *supra*.

Un “marco humano aceptor”, para los propósitos de esta invención, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena liviana (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH), derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco humano aceptor “derivado de” un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender su misma secuencia de aminoácidos, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas formas de realización, el marco humano aceptor VL es idéntico en términos de secuencia a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana VL o la secuencia de marco de consenso humano.

“Afinidad” se refiere a la intensidad de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, de acuerdo con la presente solicitud, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su compañero Y, en general, puede ser representada por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes

conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente solicitud. Las formas de realización específicas ilustrativas y ejemplares para la medición de la afinidad de unión se describen en los párrafos más adelante.

Un anticuerpo “madurado para afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR, según su sigla en inglés), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, donde dichas alteraciones logran un perfeccionamiento en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

El término “dominio de unión” significa una parte de un compuesto o una molécula que se une específicamente a un blanco de epítipo, antígeno, ligando o receptor. Los dominios de unión incluyen, sin limitación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, recombinados, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o sus porciones (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv–Fc, aficuerpos, nanocuerpos y dominios VH y/o VL de anticuerpos), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas que tienen un compañero de unión identificado.

“Funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: la unión C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, conforme a sus siglas en inglés); la unión de receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC, según su sigla en inglés); fagocitosis; regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, que incluyen, sin limitación, un agente citotóxico.

El término "agente citotóxico" de acuerdo con la presente solicitud se refiere a un agente que inhibe o evita una función celular, y/o que causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la especie *Catharantus roseus* (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes de intercalación); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, que incluyen fragmentos y/o sus variantes; y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos que se describen a continuación.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen comúnmente la molécula de ácido nucleico, si bien la molécula de ácido nucleico se presenta en forma extracromosómica o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y liviana de anticuerpo (o sus fragmentos), que incluyen dichas moléculas de ácido nucleico en un solo vector o en vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD3" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y liviana de anticuerpo (o sus fragmentos), que incluyen dichas moléculas de ácido nucleico

en un solo vector o en vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "vector", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está ligada. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación, al igual que el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales están funcionalmente ligados. Dichos vectores se denominan, en esta solicitud, "vectores de expresión".

Los términos "célula huésped", "estirpe celular huésped" y "cultivo de célula huésped" se usan de modo indistinto, y se refieren a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, que incluye la descendencia de dichas células. Las células huéspedes incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula primariamente transformada y la descendencia de allí derivada, sin consideración de la cantidad de pasajes. La descendencia puede no ser completamente idéntica, en términos del contenido de ácido nucleico, con respecto a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. Se incluye en esta solicitud la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la detectada sistemáticamente o seleccionada en la célula originalmente transformada.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, luego de la alineación de las secuencias y de la introducción de espacios, si son necesarios, a fin de lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin consideración de ninguna sustitución conservadora como parte

de la identidad de secuencia. La alineación, para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, puede lograrse de diversas maneras, que se encuentran dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos de libre disponibilidad tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud total de las secuencias comparadas. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos son generados usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue diseñado por Genentech, Inc., y se ha presentado el código fuente con documentación del usuario en la Oficina de Copyright de los Estados Unidos de América, Washington D. C., 20559, donde se encuentra registrado bajo el Registro U. S. Copyright Nro. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de libre acceso al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para el uso en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A con respecto a una secuencia de aminoácidos determinada B (que, alternativamente, puede expresarse como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula de la siguiente manera:

100 por la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se establezca específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente solicitud se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente, usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se presenta en una forma tal de modo de permitir la eficacia de la actividad biológica de un ingrediente activo allí contenido, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administrará la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, sin limitación, un regulador, un excipiente, estabilizador o conservante.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, de una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para el logro del resultado profiláctico o terapéutico deseado. Una cantidad eficaz, en esta solicitud, puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es además aquella en la cual

cualquier efecto tóxico o nocivo del tratamiento es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o la demora del inicio de la enfermedad, lo que incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermediarios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la reducción de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de aquellos que sufren de la enfermedad, la disminución de la dosis de otras medicaciones necesarias para el tratamiento de la enfermedad, el aumento del efecto de otra medicación, tal como mediante el direccionamiento, la demora del avance de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto en la reducción del número de células cancerosas; la reducción del tamaño del tumor; la inhibición (es decir, la disminución de la velocidad hasta cierto alcance, o deseablemente, la detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; la inhibición (es decir, la disminución de la velocidad hasta cierto alcance, y deseablemente, la detención) de la metástasis tumoral; la inhibición, hasta cierto alcance, del crecimiento tumoral; y/o el alivio, hasta cierto alcance, de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Una cantidad eficaz puede ser administrada en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr el tratamiento profiláctico o terapéutico, o bien directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse

en conjunto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este modo, una “cantidad eficaz” puede ser considerada en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un solo agente es suministrado en una cantidad eficaz si, en conjunto con uno o más agentes adicionales, puede lograrse, o se logra, un resultado deseable.

De acuerdo con la presente solicitud, el término “tratamiento” (y sus variaciones gramaticales, como “tratar” o “que trata”) se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo tratado, y puede realizarse o bien para la profilaxis, o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución del índice del avance de la enfermedad, la mejoría o el alivio de la enfermedad, y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para demorar el desarrollo de una enfermedad, o para disminuir el avance de una enfermedad.

De acuerdo con la presente solicitud, la “demora del avance” de un trastorno o de una enfermedad significa diferir, obstaculizar, disminuir el avance, retardar, estabilizar, y/o posponer el desarrollo de la enfermedad o del trastorno (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer). Esta demora puede ser de diversos períodos de tiempo, de acuerdo con los antecedentes de la enfermedad y/o el individuo tratado. Como se evidente para el experto en la técnica, una demora suficiente o significativa puede, en efecto, abarcar la prevención, en términos de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa tardía, tale como el desarrollo de metástasis, puede ser demorado.

El término “reducir” o “inhibir” significa la capacidad de causar una disminución general, por ejemplo, del 20% o más, del 50% o más, o del 75%, 85%, 90%, 95%, o más. En ciertas formas de realización, la reducción o inhibición pueden referirse a la función efectora de un anticuerpo que es mediada por la región Fc de anticuerpo, donde dichas funciones efectoras específicamente incluyen la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, conforme a sus siglas en inglés), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, conforme a sus siglas en inglés), y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP, conforme a sus siglas en inglés).

Un "agente quimioterapéutico" se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; muestras de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina,

fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliquemicina, especialmente, caliquemicina gamma1I y caliquemicina omega1I (ver, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183–186 (1994)); CDP323, un inhibidor de la alfa-4 integrina oral; dinamicina, que incluye dinamicina A; una esperamicina; al igual que el cromóforo neocarzinoestatina y cromoforos antibióticos relacionados de cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (que incluye ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección liposómica de doxorrubicina HCl (DOXIL®), doxorrubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorrubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una eptilona y 5-fluoruracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didaoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; agentes antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;

reabastecedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; eliptinio acetato; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINA®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula diseñada con albúmina de paclitaxel (ABRAXANETM) y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, que incluyen vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, que incluye bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonates tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONAL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular, aquellos que inhiben la

expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anormal, tales como PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R, conforme a sus siglas en inglés); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersenio sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico, conforme a sus siglas en inglés) (ver definición a continuación); inhibidores de tirosina quinasa; inhibidores de serina-treonina quinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; al igual que combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en la presente solicitud incluyen “agentes antihormonales” o “agentes terapéuticos endocrinos” que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden favorecer el crecimiento de cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, que incluyen, sin limitación: antiestrógenos con perfil mixto agonista/antagonista, que contemplan tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno

(FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERM, conforme a sus siglas en inglés) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógeno (ER, conforme a sus siglas en inglés), inhibir la unión de ADN, aumentar el recambio de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, que incluyen inhibidores de la aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) e inhibidores de la aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDAX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de la aromatasa que incluyen vorozol (RIVISOR®), megestrol acetato (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, que incluyen leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserrelina, buserrelina y triptorelina; esteroideos sexuales, que incluyen progestinas tales como megestrol acetato y medroxiprogesterona acetato, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, todo ácido transretionico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores descendentes de receptores de estrógenos (ERD, conforme a sus siglas en inglés); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, al igual que combinaciones de dos o más de los anteriores.

El término "agente inmunosupresor", de acuerdo con la presente solicitud, para la terapia complementaria, se refiere a agentes que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del mamífero aquí tratado. Esto incluye agentes que suprimen la producción de citoquina, que regulan en forma descendente o suprimen la expresión de autoantígeno, o que enmascaran antígenos de MHC (complejo mayor de histocompatibilidad, conforme a sus siglas

en inglés). Ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (ver Patente de los Estados Unidos Nro. 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios tales como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrieno; antagonistas de purina tales como azatioprina o micofenolato mofetilo (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara antígenos de MHC, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticoesteroides o glucocorticoesteroides o análogos de glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, que incluye SOLU-MEDROL[®] metilprednisolona sodio succinato y dexametasona; inhibidores de dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); agentes antipalúdicos tales como cloroquina e hidroxiclороquina; sulfasalazina; leflunomida; citoquina o anticuerpos de receptor de citoquina que incluyen anticuerpos anti-interferón-alfa, -beta, o -gamma, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral (TNF, conforme a sus siglas en inglés)-alfa (infliximab (REMICADE[®]) o adalimumab), anti-TNF-alfa inmunoadhesina (etanercept), anticuerpos anti-TNF-beta, anticuerpos anti-interleuquina-2 (IL-2) y anticuerpos anti-receptor de IL-2, y anticuerpos anti-receptor de interleuquina-6 (IL-6) y antagonistas (tales como ACTEMRA[™] (tocilizumab)); anticuerpos anti-LFA-1, que incluyen anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina antilinfocítica heteróloga; anticuerpos pan-T, preferentemente, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión LFA-3 (WO 90/08187 publicada el 26/7/90); estreptoquinasa; factor-beta de crecimiento de transformación (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN

del huésped; FK506; RS-61443; clorambucil; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de células T (Cohen *et al.*, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.114.721); fragmentos de receptor de células (Offner *et al.*, *Science*, 251: 430–432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989); y WO 91/01133); antagonistas de BAFF (factor de activación de células B, conforme a sus siglas en inglés) tales como anticuerpos BAFF y anticuerpos BR3 y antagonistas de zTNF4 (para una reseña, ver Mackay and Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113–5 (2002) y ver además la definición a continuación); agentes biológicos que interfieren con las señales de linfocito T cooperador, tales como anti-receptor CD40 o anti-ligando CD40 (CD154), que incluye anticuerpos bloqueantes para CD40–ligando CD40 (por ejemplo, Durie *et al.*, *Science*, 261: 1328–30 (1993); Mohan *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 1470–80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck *et al.*, *Science*, 265: 1225–7 (1994)); y anticuerpos de receptor de células T (EP 340,109) tales como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferidos en esta solicitud incluyen ciclofosfamida, clorambucil, azatioprina, leflunomida, MMF, o metotrexato.

El término “antagonista de unión del eje PD-1” se refiere a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión del eje PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, de modo de eliminar la disfunción de células T resultante de la señalización en el eje de señalización PD-1 – donde un resultado es la restauración o el mejoramiento de la función de células T (por ejemplo, la proliferación, la producción de citoquina, la muerte celular de objetivo). De acuerdo con la presente solicitud, un antagonista de unión del eje PD-1 incluye un antagonista de unión de PD-1, un antagonista de unión de PD-L1 y un antagonista de unión de PD-L2.

El término “antagonista de unión de PD-1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, o anula la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-

L1, PD-L2, o que interfiere con dicha transducción. En algunas formas de realización, el antagonista de la unión de PD-1 es una molécula que inhibe la unión de PD-1 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de la unión de PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Por ejemplo, los antagonistas de la unión de PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, sus fragmentos de unión de antígeno, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, o anulan la transducción de señal resultante de la interacción de PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2, o que interfieren con dicha transducción. En una forma de realización, un antagonista de la unión de PD-1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por, o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-1, de modo de tornar una célula T disfuncional menos disfuncional (por ejemplo, mejorando las respuestas efectoras al reconocimiento de antígeno). En algunas formas de realización, el antagonista de la unión de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, un antagonista de la unión de PD-1 es MDX-1106 (nivolumab) descrito en esta solicitud. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión de PD-1 es MK-3475 (lambrolizumab) descrito en esta solicitud. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión de PD-1 es CT-011 (pidilizumab) descrito en esta solicitud. En otro aspecto específico, un antagonista de la unión de PD-1 es AMP-224 descrito en esta solicitud.

El término “antagonista de la unión de PD-L1” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, o anula la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1, o que interfiere con dicha transducción. En algunas formas de realización, un antagonista de la unión de PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el

antagonista de la unión de PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunas formas de realización, los antagonistas de la unión de PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, sus fragmentos de unión de antígeno, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben o anulan la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, B7-1, o que interfieren con dicha transducción. En una forma de realización, un antagonista de la unión de PD-L1 reduce la señal coestimulante negativa mediada por, o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1, de modo de tornar un linfocito T disfuncional, menos disfuncional (por ejemplo, mejorando respuestas efectoras al reconocimiento de antígeno). En algunas formas de realización, un antagonista de la unión de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 descrito en esta solicitud. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 descrito en esta solicitud. En aun otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A descrito en esta solicitud. Aun en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 descrito en esta solicitud.

El término “antagonista de la unión de PD-L2” se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, o anula la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, o que interfiere con dicha transducción. En algunas formas de realización, un antagonista de unión de PD-L2 es una molécula que inhibe la unión de PD-L2 a uno o más de sus compañeros de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión de PD-L2 inhibe la unión de PD-L2 a PD-1. En algunas formas de realización, los antagonistas de PD-L2 incluyen anticuerpos anti-PD-L2, sus fragmentos de unión de antígeno, inmunoadhesinas, proteínas de fusión,

oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben o anulan la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L2 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como PD-1, o que interfieren con dicha transducción. En una forma de realización, un antagonista de unión de PD-L2 reduce la señal coestimulante negativa mediada por, o a través de proteínas de superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L2, de modo de tornar una célula T disfuncional, menos disfuncional (por ejemplo, mejorando respuestas efectoras al reconocimiento de antígeno). En algunas formas de realización, un antagonista de unión de PD-L2 es una inmunoadhesina.

El término “tumor” se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, malignas o benignas, y a todas las células y los tejidos cancerosos y precancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente excluyentes, conforme a lo referido en la presente solicitud.

Los términos “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos asociados con algún grado de proliferación celular anormal. En una forma de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos, que se caracteriza típicamente por la proliferación o el crecimiento celular desregulado. Ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano), blastoma, sarcoma y leucemia.

Los términos “trastorno proliferativo de células B” se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación anormal de células B. En una forma de realización, el trastorno proliferativo de células B es cáncer.

El “trastorno proliferativo de células B” incluye enfermedad de Hodgkin, que incluye enfermedad de Hodgkin predominante linfocitaria (LPHD, conforme a sus siglas en inglés); linfoma no hodgkiniano (NHL, conforme a sus siglas en inglés); linfomas de células centrales foliculares (FCC, conforme a sus siglas en inglés); leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL); y tricoleucemia. El linfoma no hodgkiniano incluye linfoma no hodgkiniano (NHL) de bajo grado/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL, conforme a sus siglas en inglés), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células no disociadas pequeñas de alto grado, NHL de tipo enfermedad voluminosa, linfoma linfocítico plasmacitoide, linfoma de células de manto, linfoma relacionado con sida y macroglobulinemia de Waldenstrom. Se contempla además el tratamiento de la recaída de estos tipos de cáncer. LPHD es un tipo de enfermedad de Hodgkin que tiende a tener una recaída frecuente a pesar del tratamiento de radiación o la quimioterapia. CLL es uno de cuatro tipos principales de leucemia. Un cáncer de células B maduras denominadas linfocitos, CLL, se manifiesta mediante la acumulación progresiva de células en la sangre, la médula ósea y los tejidos linfáticos. El linfoma inactivo es una enfermedad incurable de lento crecimiento, en la cual el paciente promedio sobrevive entre 6 y 10 años luego de numerosos períodos de remisión y recaída.

El término “linfoma no hodgkiniano” o “NHL”, de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un cáncer del sistema linfático diferente de los linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin pueden distinguirse generalmente de los linfomas no hodgkinianos por la presencia de células de Reed–Sternberg en los linfomas de Hodgkin, y la ausencia de dichas células, en los linfomas no hodgkinianos. Ejemplos de linfomas no hodgkinianos contemplados por el término de acuerdo con la presente solicitud incluyen cualquiera de estos que sea

identificado como tal por el experto en la técnica (por ejemplo, un oncólogo o patólogo) de acuerdo con esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tales como el esquema de Linfoma Europeo–Americano Revisado (REAL, conforme a sus siglas en inglés) como se describe en *Color Atlas of Clinical Hematology, Third Edition*; A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Limited 2000) (ver, en particular, Fig. 11.57, 11.58 y/o 11.59). Ejemplos más específicos incluyen, sin limitación, NHL resistente o de recaída, NHL de bajo grado de línea frontal, NHL Etapa III/IV, NHL resistente a la quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblástico de precursor B, linfoma linfocítico pequeño, leucemia y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño linfocítico crónico de células B, linfoma prolinfocítico de células B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmaclástico, linfoma de células B de zona marginal, linfoma de zona marginal esplénico, linfoma de zona marginal extranodal – MALT, linfoma de zona marginal nodal, tricoleucemia, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de bajo grado /folicular, NHL de grado intermedio/folicular, linfoma de células de manto, linfoma de centro folicular (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma de células B grandes difuso, NHL agresivo (que incluye NHL de línea frontal agresivo y NHL de recaída agresivo), recaída de NHL como consecuencia, o resistente, al trasplante de células madre autólogas, linfoma de células B grandes mediastinales primarias, linfoma de efusión primaria, NHL inmunoblástico de algo grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células no disociadas pequeñas de alto grado, NHL de tipo enfermedad voluminosa, linfoma de Burkitt, leucemia y/o linfoma linfoblástica de células T precursoras (periféricas), linfoma y/o leucemia de células T adultas, leucemia linfocítica crónica y/o leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular grande, micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfoma de linfocitos citolíticos naturales/células T extranodales (tipo nasal), linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma de

células T hepatoesplénicas, linfoma de células T de tipo paniculitis subcutánea, linfomas de piel (cutáneos), linfoma de células grandes anaplásico, linfoma angiocéntrico, linfoma de células T intestinales, linfoma de células T periféricas (no especificado de otro modo) y linfoma de células T angioinmunoblástico.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratas y ratones). En ciertas formas de realización, el individuo o sujeto es un humano.

El término “prospecto” se usa para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la terapia de combinación, las contraindicaciones y/o advertencias relacionadas con el uso de dichos productos terapéuticos.

De acuerdo con la presente solicitud y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/una”, “o” y “el/la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La referencia a “alrededor de” un valor o parámetro en esta solicitud incluye (y describe) variaciones que se dirigen a dicho valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a “alrededor de X” incluye la descripción de “X”.

Se entiende que los aspectos y las variaciones de la invención descrita en esta solicitud incluyen aspectos y variaciones “que consisten en” y/o “que consisten esencialmente en”.

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS.

En un aspecto, la invención se sustenta, en parte, en anticuerpos anti-CD79b. En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-

CD79b que comprenden un dominio de unión CD79b y un dominio de unión CD3. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD79b son anticuerpos anti-CD79b biespecíficos dependientes de células T (TDB). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades proliferativas de células B.

A. Anticuerpos anti-CD79b ejemplares.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a CD79b. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el dominio de unión CD79b se une a SEQ ID NO: 63.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano con un valor K_D inferior a alrededor de 25 nM como un anticuerpo IgG bivalente, de rama dual. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano con un valor K_D inferior a alrededor de 10 nM. En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano con un valor K_D inferior a alrededor de 5 nM. En algunas formas de realización, el valor K_D se determina por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el K_D es determinado por BIACORE. En algunas formas de realización, el valor K_D es determinado por CD79b inmovilizado a una baja densidad.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a una célula B (por ejemplo, célula BJAB) con un valor EC_{50} de menos de alrededor de 150 ng/ml como un anticuerpo IgG bivalente, de rama dual. En

algunas formas de realización, el valor EC_{50} es menos de alrededor de 100 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 75 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 50 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es determinado por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el EC_{50} es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 experimentos. En algunas formas de realización, la unión a una célula B se determina por FACS.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, dominio de unión CD79b) se une a CD79b humano, y se une a una célula B (por ejemplo, célula BJAB) con un EC_{50} de menos de alrededor de 1.5 ug/ml en un formato monovalente (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-CD79b que comprende un CD79b y dominio de unión CD3). En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 1 ug/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 0.75 ug/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 0.5 ug/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 0.25 ug/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es determinado por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el EC_{50} es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 experimentos. En algunas formas de realización, la unión a una célula B se determina por FACS.

Anticuerpo CD79.A7 y sus variantes.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-H2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VH HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En una forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y (c) HVR-H3 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En una forma de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD79b de la invención comprende dominio de unión CD79b que comprende en (a) un dominio VH que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VH HVR seleccionadas

de (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y (iii) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9; y (b) un dominio VL que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (i) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunas formas de realización, HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR–L2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 12.

En cualquiera de las anteriores formas de realización, un anticuerpo anti-CD79b es humanizado. En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b comprende HVR como en cualquiera de las anteriores formas de realización, y adicionalmente comprende un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, y/o 29. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones en relación con la secuencia de referencia, si bien un anticuerpo anti-CD79b que comprende dicha secuencia retiene la capacidad de unión a CD79b. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o deleteados en SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, y/o 29. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o

deleciones se producen en regiones fuera de la HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VH en SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, y/o 29, incluyendo modificaciones postraduccion de dicha secuencia. En una particular forma de realizacion, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoacidos de SEQ ID NO: 5, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoacidos de SEQ ID NO: 8, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoacidos de SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoacidos de SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, y/o 30. En ciertas formas de realizacion, una secuencia VL que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones en relacion con la secuencia de referencia, si bien un anticuerpo anti-CD79b que comprende dicha secuencia retiene la capacidad de union a CD79b. En ciertas formas de realizacion, un total de 1 a 10 aminoacidos han sido sustituidos, insertados y/o deleteados en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, y/o 30. En ciertas formas de realizacion, las sustituciones, inserciones, o deleciones se producen en regiones fuera de la HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VL en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, y/o 30, incluyendo modificaciones postraduccion de dicha secuencia. En una particular forma de realizacion, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoacidos de SEQ ID NO: 10; (b) HVR-L2 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b provisto en esta solicitud. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-CD79b que comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 19 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 20. En ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de un fragmento de CD79b que consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

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

Anticuerpo SN8.nuevo y sus variantes.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VH HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En una forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En una forma de realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En otro aspecto, un anticuerpo anti–CD79b de la invención comprende el dominio de unión CD79b que comprende en (a) un dominio VH que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VH HVR seleccionadas de (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y (iii) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 33; y (b) un dominio VL que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VL HVR seleccionadas de (i) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–CD79b que comprende un dominio de unión CD79b que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36.

En cualquiera de las anteriores formas de realización, un anticuerpo anti–CD79b es humanizado. En una forma de realización, un anticuerpo anti–CD79b comprende HVR como en cualquiera de las anteriores formas de realización, y adicionalmente comprende un marco humano aceptor, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD79b comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En ciertas formas de realización, una secuencia VH que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones en relación con la secuencia de referencia, si bien un anticuerpo anti-CD79b que comprende dicha secuencia retiene la capacidad de unión a CD79b. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o deletados en SEQ ID NO: 37. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o deleciones se producen en regiones fuera de la HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VH en SEQ ID NO: 37, incluyendo modificaciones postraducción de dicha secuencia. En una particular forma de realización, la VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. En ciertas formas de realización, una secuencia VL que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones en relación con la secuencia de referencia, si bien un anticuerpo anti-

CD79b que comprende dicha secuencia retiene la capacidad de unión a CD79b. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o deleteados en SEQ ID NO: 38. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o deleciones se producen en regiones fuera de la HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD79b comprende la secuencia VL en SEQ ID NO: 38, incluyendo modificaciones postraduccion de dicha secuencia. En una particular forma de realización, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b, donde el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las formas de realización proporcionadas anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccion de dichas secuencias.

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

En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-CD79b de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización pueden incorporar cualquiera de los rasgos, individualmente o en combinación, que se describen en las Secciones 1–7 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpo.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en esta solicitud tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una forma de realización, el K_d se mide por un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA, conforme a sus siglas en inglés). En una forma de realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de solución de Fabs para antígeno se mide mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de valoración de antígeno no marcado, luego, la captura de antígeno ligado con una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865–881(1999)). Con el objetivo de establecer las condiciones para el ensayo, se revisten placas de múltiples receptáculos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en 50 mM carbonato de sodio ($\text{pH } 9.6$), y posteriormente, se bloquea con 2% (p/v) de albúmina sérica bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de [^{125}I]-antígeno con diluciones seriales de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57: 4593–4599 (1997)). El Fab de interés es luego incubado durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar

durante un período mayor (por ejemplo, alrededor de 65 horas) de modo de garantizar el logro del equilibrio. A continuación, las mezclas son transferidas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución es entonces eliminada, y la placa se lava ocho veces con 0.1% polisorbato 20 (TWEEN-20[®]) en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 μ l/receptáculo de centellante (MICROSCINT-20[™]; Packard), y las placas se recuentan en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan un valor inferior o igual a 20% de unión máxima se seleccionan para el uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra forma de realización, el valor K_d se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie BIACORE[®]. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un instrumento BIACORE[®]-2000 o un instrumento BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En una forma de realización, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye antígeno con 10 mM acetato de sodio, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0.2 μ M), antes de la inyección, con un caudal de 5 μ l/minuto, a fin de lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta 1 M etanolamina a fin de bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones de Fab seriales dobles (0.78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante 0.05% polisorbato 20 (TWEEN-20[™]) (PBST) a 25°C con un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Se calculan los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) usando un simple modelo de unión de uno a uno de Langmuir (BIACORE[®] Evaluation

Software versión 3.2) mediante la adaptación simultánea de los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación de equilibrio (K_d) como la relación k_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, la referencia de Chen, Y. *et al.* (1999): *J. Mol. Biol.*, 293: 865–881. Si el índice de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces puede determinarse el índice de asociación usando una técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm; pase de banda de 16 nm) a 25°C, de un anticuerpo antiantígeno, 20 nM (forma Fab), en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments), o un espectrofotómetro 8000–series SLM–AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una sonda probeta.

2. Fragmentos de anticuerpos.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'–SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una reseña de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver la referencia de Hudson *et al.*, *Nat. Med.*, 9: 129–134 (2003). Para una reseña de fragmentos scFv, ver, por ejemplo, la referencia de Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Anticuerpos*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. (Springer–Verlag, New York), pp. 269–315 (1994); ver, además, la Solicitud Internacional WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.571.894 y 5.587.458. Para una descripción de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión de receptor de recuperación, y que tienen mayor semivida *in vivo*, ver la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, la Patente EP 404.097; la Solicitud Internacional WO 1993/01161; las referencias de Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448 (1993). Se describen, asimismo, triacuerpos y tetracuerpos en la referencia de Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada, o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.248.516).

Los fragmentos de anticuerpos pueden prepararse por diversa técnicas, que incluyen, sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, al igual que la producción por células huéspedes recombinadas (por ejemplo, *E. coli* o fagos), como se describe en la presente solicitud.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en esta solicitud es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; y en la referencia de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como el mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “con clase cambiada”, en el cual la clase o subclase ha sido cambiada, respecto de aquella del anticuerpo

parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión de antígeno.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Habitualmente, un anticuerpo no humano es humanizado con el objetivo de reducir la inmunogenicidad para los humanos, y a la vez, retener la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables, en los cuales las HVR, por ejemplo, CDR (o sus porciones) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o sus porciones) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado, en forma opcional, además comprenderá por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas formas de realización, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado están sustituidos con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual derivan los residuos de HVR), por ejemplo, de manera de restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para su preparación son reseñados, por ejemplo, en la referencia de Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619–1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en las referencias de Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323–329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029–10033 (1989); las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; las referencias de Kashmiri *et al.*, *Methods* 36: 25–34 (2005) (que describe el injerto de región determinante de especificidad SDR (conforme a sus siglas en inglés)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489–498 (1991) (que describe la “reformación de superficie”); Dall’Acqua *et al.*, *Methods* 36: 43–60 (2005) (que describe la “mezcla de FR”); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36: 61–68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83: 252–260 (2000) (que describe el enfoque de “selección guiada” para la mezcla de FR).

Las regiones de marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, sin limitación: regiones de marco seleccionadas usando el método de "mejor adaptación" (ver, por ejemplo, la referencia de Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); regiones de marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada o liviana (ver, por ejemplo, las referencias de Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); regiones de marco maduras humanas (somáticamente mutadas) o regiones de marco de líneas germinales humanas (ver, por ejemplo, la referencia de Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13: 1619–1633 (2008)); y regiones de marco derivadas de la detección sistemática de genotecas de FR (ver, por ejemplo, la referencia de Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 10678–10684 (1997) y la referencia de Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271: 22611–22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el arte. Los anticuerpos humanos se describen, generalmente, en las referencias de van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse por medio de la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado de manera de producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al desafío antigénico. Dichos animales habitualmente contienen la totalidad o una porción de los *loci* de inmunoglobulina humana, que reemplazan los *loci* de inmunoglobulina endógenos o que se presentan extracromosómicamente o integrados en forma aleatoria en los

cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los *loci* de inmunoglobulina endógenos han sido generalmente inactivados. Para una reseña de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, ver la referencia de Lonberg, *Nat. Biotech.* 23: 1117–1125 (2005). Ver, además, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.041.870, que describe la tecnología K–M MOUSE®, y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden ser adicionalmente modificadas, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden ser preparados mediante métodos sobre la base de hibridoma. Se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón y humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (ver, por ejemplo, las referencias de Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de células B humanas se describen además en la referencia de Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557–3562 (2006). Otros métodos incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de estirpes celulares de hibridoma) y en la referencia de Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26 (4): 265–268 (2006) (que describe hibridomas de humano–humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología

Trioma) es también descripta en las referencias de Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3): 927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental y Clinical Pharmacology*, 27 (3): 185–91 (2005).

Los anticuerpos humanos además pueden ser generados por medio del aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de genotecas de exhibición de fagos derivadas de humanos. Dichas secuencias de dominio variable entonces pueden ser combinadas con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos se describen a continuación.

5. Anticuerpos derivados de genotecas.

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante el sometimiento a la detección sistemática, de genotecas de combinación, para la detección de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, son bien conocidos en la técnica una diversidad de métodos para la generación de genotecas de exhibición de fagos y el sometimiento a la detección sistemática de dichas genotecas para la determinación de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos son reseñados, por ejemplo, en las referencias de Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178: 1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), son adicionalmente descriptos, por ejemplo, en las referencias de McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552–554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992); Marks y Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248: 161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299–310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467–12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284 (1–2): 119–132 (2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, los repertorios de genes VH y VL son clonados en forma separada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, conforme a sus siglas en inglés) y son recombinados aleatoriamente en genotecas de fagos, que pueden luego ser sometidas a la detección sistemática para la detección de fagos de unión de antígeno, como se describe en las referencia de Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433–455 (1994). Los fagos habitualmente exhiben fragmentos de anticuerpos, o bien como fragmentos de cadena simple Fv (scFv), o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno, sin el requisito de la construcción de hibridomas. Alternativamente, puede clonarse el repertorio sin tratamiento previo (por ejemplo, de humano) de manera de proporcionar una sola fuente de anticuerpos a una amplia gama de no autoantígenos y además, de autoantígenos, sin ninguna inmunización, como lo describen Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725–734 (1993). Finalmente, las genotecas sin tratamiento previo pueden además prepararse en forma sintética, mediante la clonación de segmentos de genes V no redispuestos de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para la codificación de las regiones altamente variables CDR3 y llevar a cabo la redistribución *in vitro*, como lo describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). Las Publicaciones de Patente que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos comprenden, por ejemplo: Patente de los Estados Unidos Nro. 5.750.373, y Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en esta solicitud.

6. *Anticuerpos multiespecíficos.*

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En ciertas formas de realización, una de las especificidades de unión es para CD79b, y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de CD79b. Los anticuerpos biespecíficos además pueden usarse para la localización de agentes citotóxicos para células que expresan CD79b. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-CD79b aislados que se unen a CD79b y CD3 (es decir, que comprenden un dominio de unión CD79b y un dominio de unión CD3). En ciertas formas de realización, una de las especificidades de unión es para CD3 (por ejemplo, CD3 ϵ o CD3 γ), y la otra, es CD79b. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une a un polipéptido humano CD3 o un polipéptido de macaco (cino) CD3. En algunas formas de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 cino es un polipéptido humano CD3 ϵ o un polipéptido cino CD3 ϵ , respectivamente. En algunas formas de realización, el polipéptido CD3 humano o el polipéptido CD3 cino es un polipéptido humano CD3 γ o un polipéptido cino CD3 γ , respectivamente. En ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b que comprende un dominio de unión CD3 que se une a un epítipo dentro de un fragmento de CD3 (por ejemplo, CD3 ϵ humano) que consiste en los aminoácidos 1–26 o 1–27 de CD3 ϵ humano. En algunas formas de realización, el

anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b es un anticuerpo biespecífico IgG.

En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3ε con un valor Kd de 250 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3ε con un valor Kd de 100 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3ε con un valor Kd de 15 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3ε con un valor Kd de 10 nM o inferior. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 se une al polipéptido humano CD3ε con un valor Kd de 5 nM o inferior.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, que se unen a CD79b y CD3, estos comprenden un dominio de unión CD3, donde el dominio de unión CD3 comprende las regiones hipervariables (HVR) (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 41; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 43, y (iii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En algunos casos, el dominio de unión CD3 puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 57, y/o un dominio variable de cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el dominio de unión CD3 puede tener un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58. En un caso particular, el dominio de unión CD3 puede ser 40G5c, o uno de sus derivados o pariente clonal.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende las HVR (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende las HVR (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 43; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, que se unen a CD79b y CD3, el dominio de unión CD3 comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende (a) un dominio VH que comprende (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y (iii) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 47; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y (iii) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En algunos casos, el dominio de unión CD3 puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 59, y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 60. En algunos casos, el dominio de unión CD3 puede tener un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60. En un caso particular, el dominio de unión CD3 puede ser 38E4v1, o uno de sus derivados o sus parientes clonales.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende las HVR (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende las HVR (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y (b)

un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, que se unen a CD79b y CD3, el dominio de unión CD3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En algunas formas de realización, el dominio de unión CD3 comprende (a) a dominio VH que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID NO: 53; y (b) un dominio VL que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 puede tener un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 61, y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%

de identidad de secuencia) con respecto a, o la secuencia de, SEQ ID NO: 62. En algunos casos, el dominio de unión CD3 puede tener un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62. En un caso particular, el anticuerpo anti-CD3 puede ser UCHT1.v9, o uno de sus derivados o sus parientes clonales.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende las HVR (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende las HVR (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b comprende (i) un dominio de unión CD79b que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y (ii) un dominio de unión CD3 que comprende (a) un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 y (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de muerte de células B EC_{50} de menos de alrededor de 100 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 50 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 25 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 20 ng/ml. En algunas formas de realización, el EC_{50} es menos de alrededor de 15 ng/ml. En algunas formas de realización, la muerte de células B es muerte de célula B endógena. En algunas formas de realización, la muerte de células B es muerte de célula B de estirpe celular, por ejemplo, la estirpe celular BJAB, la estirpe celular WSU-CLCL2, la estirpe celular OCI-Ly-19. En algunas formas de realización, el EC_{50} es determinado por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el EC_{50} es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 experimentos. En algunas formas de realización, el EC_{50} es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 donantes.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b mata por lo menos alrededor de 60% de células B en una concentración de 5000 ng/ml. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b mata por lo menos alrededor de 80% de células B en una concentración de 5000 ng/ml. El anticuerpo anti-CD79b mata por lo menos alrededor de 90% de células B en una concentración de 5000 ng/ml. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células B son una o más de las estirpes celulares B SU-CHL-6, CoHH2, BJAB, WSU-DLCL2, Sc-1, SU-CHL-8, GRANTA-519, Nalm-6, Ramos, y/o OCI-Ly-19. En algunas formas de realización, el EC_{50} es determinado por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el EC_{50} es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 experimentos. En algunas

formas de realización, el EC₅₀ es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 donantes.

En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos anti-CD79b, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de activación de células T citotóxicas EC₅₀ de menos de alrededor de cualquiera de 50 ng/ml. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de activación de células T citotóxicas EC₅₀ de menos de alrededor de 25 ng/ml. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b tiene un valor de activación de células T citotóxicas EC₅₀ de menos de alrededor de menos de 20 ng/ml. En algunas formas de realización, la activación de células T citotóxicas se mide por el % de células CD69+CD25+ T en células CD8+ T. En algunas formas de realización, el EC₅₀ es determinado por cualquier método descrito en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización, el EC₅₀ es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 experimentos. En algunas formas de realización, el EC₅₀ es el promedio de alrededor de cualquiera de 5 o 10 donantes.

Las técnicas para la preparación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, sin limitación, la coexpresión recombinada de dos pares de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver las referencias de Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y el diseño de “botón en agujero” (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos además pueden prepararse mediante el diseño de efectos de conducción electrostática para la preparación de anticuerpo Fc-moléculas heterodímeras (WO 2009/089004A1); el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina

para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, la referencia de Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547–1553 (1992)); el uso de la tecnología de "diacuerpos" para la preparación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, la referencia de Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444–6448 (1993)); y el uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv) (ver, por ejemplo, la referencia de Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); y la preparación de anticuerpos triespecíficos como lo describen, por ejemplo, Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos pulpo", se incluyen también en la presente solicitud (ver, por ejemplo, la Solicitud US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento de la presente invención además incluye un "FAB de acción dual" o "DAF (según su sigla en inglés)", que comprende un sitio de unión de antígeno que se une a CD79b al igual que otro antígeno diferente (ver, por ejemplo, la solicitud US 2008/0069820).

7. Variantes de anticuerpos.

En ciertas formas de realización, se contemplan las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en esta solicitud. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución a fin de lograr la construcción

final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión de antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y delección.

En ciertas formas de realización, se proporcionan las variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1, bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Los cambios más sustanciales se proporcionan en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares", y como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés, y los productos pueden someterse a la detección sistemática para la detección de una actividad deseada, por ejemplo, la unión de antígeno retenida o mejorada, menor inmunogenicidad o mejor ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

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

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que afectan la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras involucrarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro de otra clase.

Un tipo de variante de sustitución supone la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, las variantes resultantes seleccionadas para el posterior estudio tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoramientos) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, mayor afinidad, menor inmunogenicidad), en relación con el anticuerpo parental, o habrán retenido sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo progenitor. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado para afinidad, que puede ser generado, convenientemente, usando técnicas de maduración para afinidad sobre la base de la exhibición de fagos, tales como aquellas que se describen en esta solicitud. Brevemente, uno o más residuos de HVR son mutados, y los anticuerpos variantes son exhibidos en fagos y sometidos a la detección sistemática a fin de detectar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Pueden efectuarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, a fin de mejorar la afinidad de anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse en "sitios calientes" de HVR, es decir, en residuos codificados por codones que sufren la mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, la referencia de Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, 207: 179–196 (2008)), y/o residuos que se ponen en contacto con antígeno, donde la VH o VL variante resultante es ensayada a fin de establecer la afinidad de unión. La maduración para afinidad mediante la construcción y reelección a partir de genotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en la referencia de Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology*, 178: 1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas formas de

realización de maduración para afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración, mediante cualquiera de una diversidad de métodos (por ejemplo, la PCR propensa al error, la mezcla de cadenas o la mutagénesis dirigida para oligonucleótido). Entonces se crea una genoteca secundaria. Luego la genoteca se somete a la identificación sistemática a fin de identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para la introducción de diversidad involucra enfoques dirigidos a HVR, donde se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4–6 residuos de una vez). Los residuos de HVR involucrados en la unión de antígeno pueden ser identificados específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de barrido de alanina o modelado. A menudo, se apunta a CDR–H3 y CDR–L3 en particular.

En ciertas formas de realización, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan de manera sustancial la capacidad del anticuerpo para la unión a antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse en HVR alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proveen en esta solicitud) que no reduzcan de manera sustancial la afinidad de unión. Dichas alteraciones, por ejemplo, pueden encontrarse fuera de los residuos de contacto de antígeno en las HVR. En ciertas formas de realización de las secuencias variantes de VH y VL que se proveen anteriormente, cada HVR o bien no es alterada, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser apuntados para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como lo describen Cunningham y Wells (1989), *Science*, 244: 1081–1085. En este método, se identifican un residuo o grupo de residuos blanco (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu), y son reemplazados por un aminoácido neutro o negativamente

cargado (por ejemplo, alanina o polialanina), a fin de determinar si la interacción del anticuerpo con antígeno es afectada. Pueden introducirse otras sustituciones en las regiones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales; alternativa o adicionalmente, se usa una estructura de cristal de un complejo de antígeno–anticuerpo para la identificación de puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser apuntados o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden someterse a la identificación sistemática, a fin de determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo–terminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, al igual que inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N–terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo, de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

b) Variantes de glicosilación.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo provisto en esta solicitud es alterado a fin de incrementar o disminuir el alcance al cual el anticuerpo es glicosilado. La adición o deleción de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse de modo conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera de crear o eliminar uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos nativos producidos por células mamíferas típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que generalmente está unido por una conexión N a Asn297 del dominio CH2 de la

región Fc. Ver, por ejemplo, la referencia de Wright *et al.*, *TIBTECH*, 15: 26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N–acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, al igual que una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas formas de realización, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden efectuarse a fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una forma de realización, se proveen variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras de alta manosa, híbridas y complejas), medida por espectrometría de masa MALDI–TOF, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente ascendente o descendente de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener mejor función ADCC. Ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “defucosiladas” o “con deficiencia de fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US

2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 336: 1239–1249 (2004); Yamane–Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 249: 533–545 (1986); Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, en especial, en el Ejemplo 11), y estirpes celulares de noqueo (*knockout*: inactivación de genes específicos como modelo de enfermedad; una mutante individual donde se ha reemplazado un solo gen funcional por una forma no funcional del gen), tales como el gen alfa–1,6–fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO de noqueo (ver, por ejemplo, la referencia de Yamane–Ohnuki *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4): 680–688 (2006); y WO 2003/085107).

Se proporcionan asimismo variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo es biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener reducida fucosilación y/o mejor función ADCC. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean–Mairet *et al.*); Patente de los Estados Unidos Nro. 6.602.684 (Umana *et al.*); y US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Se proporcionan además variantes de anticuerpos con al menos un residuo galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener mejor función CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en las Solicitudes Internacionales WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Variantes de región Fc.

En ciertas formas de realización, una o más modificaciones de aminoácidos pueden introducirse en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en esta solicitud, a fin de generar así una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas formas de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, si bien ciertas funciones efectoras (tales como ADCC y complemento) son innecesarias o nocivas. Pueden conducirse ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* a fin de confirmar la reducción o el agotamiento de las actividades CDC o ADCC. Por ejemplo, pueden conducirse ensayos de unión de receptor Fc (FcR) de manera de garantizar que el anticuerpo carece de unión Fc γ R (y en consecuencia, probablemente carezca de actividad ADCC), si bien retiene la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, las células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de la referencia de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457–92 (1991). Ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para la evaluación de la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.500.362 (ver, por ejemplo, las referencias de Hellstrom, I., *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83: 7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 1499–1502 (1985); 5.821.337 (ver la referencia de Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.*,

166: 1351–1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactiva ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CYTOTOX 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, según su sigla en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK, según su sigla en inglés). De manera alternativa o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en la referencia de Clynes *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 95: 652–656 (1998). Los ensayos de unión C1q también pueden efectuarse a fin de confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q, y en consecuencia, carece de actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión C1q y C3c en la Solicitud Internacional WO 2006/029879 y la Solicitud Internacional WO 2005/100402. Con la finalidad de evaluar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, las referencias de Gazzano–Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996); Cragg, M. S. *et al.*, *Blood*, 101: 1045–1052 (2003); y Cragg, M. S. y M. J. Glennie, *Blood*, 103: 2738–2743 (2004)). La unión de FcRn y las determinaciones de aclaramiento/semivida *in vivo* también pueden efectuarse usando métodos conocidos en el arte (ver, por ejemplo, la referencia de Petkova, S. B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18 (12): 1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con menor función efectora incluyen aquellos con sustitución de uno o más residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.737.056). Dichas mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen la así denominada mutante

de Fc “DANA” con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.332.581).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo anti-CD79b TDB) comprende una región Fc que comprende una mutación N297G.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD79b que comprende la mutación N297G comprende uno o más dominios constantes de cadena pesada, donde los uno o más dominios constantes de cadena pesada se seleccionan de un primer dominio CH1 (CH₁₁), un primer dominio CH2 (CH₂₁), un primer dominio CH3 (CH₃₁), un segundo dominio CH1 (CH₁₂), segundo dominio CH2 (CH₂₂) y un segundo dominio CH3 (CH₃₂). En algunos casos, por lo menos uno de los uno o más dominios constantes de cadena pesada está emparejado con otro dominio constante de cadena pesada. En algunos casos, los dominios CH₃₁ y CH₃₂ comprenden, de manera independiente, una protuberancia o cavidad, y donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH₃₁ es posicionable en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₃₂. En algunos casos, los dominios CH₃₁ y CH₃₂ se encuentran en una interfaz entre dichas protuberancia y cavidad. En algunos casos, los dominios CH₂₁ y CH₂₂ comprenden independientemente una protuberancia o cavidad, y donde la protuberancia o cavidad en el dominio CH₂₁ es posicionable en la cavidad o protuberancia, respectivamente, en el dominio CH₂₂. En otros casos, los dominios CH₂₁ y CH₂₂ se encuentran en una interfaz entre dichas protuberancia y cavidad. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo IgG1.

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con mejorada o menor unión a FcR (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.737.056; WO 2004/056312, y la referencia de Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591–6604 (2001)).

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

En algunas formas de realización, se hacen alteraciones en la región Fc que logran la alterada (es decir, mayor o menor) unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.194.551, WO 99/51642, y en la referencia de Idusogie *et al.*, *J. Immunol.*, 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con mayor semivida y mejorada unión al receptor Fc neonato (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)), se describen en la Publicación US 2005/0014934A1 (Hinton *et. al*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones, que aumentan la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.371.826). Ver, además, la referencia de Duncan & Winter, *Nature*, 322: 738–40 (1988); Patente de los Estados Unidos Nro. 5.648.260; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.624.821; y WO 94/29351, que se refieren a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d). Variantes de anticuerpos diseñadas con cisteína.

En ciertas formas de realización, puede ser conveniente crear anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, “tioMAbs”, en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo están sustituidos con residuos cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del

anticuerpo. Mediante la sustitución de dichos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de ese modo en sitios accesibles del anticuerpo, y pueden usarse para la conjugación del anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármacos o restos de conector-fármaco, de modo de crear un inmunoconjugado, tal como se describe en mayor detalle en la presente solicitud. En ciertas formas de realización, pueden sustituirse cualesquiera uno o más de los siguientes residuos, con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.521.541.

e). Derivados de anticuerpos.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo proporcionado en la presente solicitud puede modificarse adicionalmente de manera de contener restos no proteínaceos adicionales conocidos en el arte y de fácil disponibilidad. Los restos adecuados para la derivación del anticuerpo incluyen, sin limitación, polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitativos de los polímeros solubles en agua incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (o bien homopolímeros o copolímeros de azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y sus mezclas. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la elaboración, debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al

anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad o el tipo de polímeros utilizados para la derivación puede determinarse sobre la base de consideraciones que incluyen, sin limitación, las propiedades particulares o las funciones del anticuerpo por mejorar, el uso del derivado de anticuerpo en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra forma de realización, se proveen conjugados de un anticuerpo y un resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente mediante la exposición a la radiación. En una forma de realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbón (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, sin limitación, longitudes de onda que no dañan células comunes, si bien calientan el resto no proteináceo hasta una temperatura a la cual las células próximas al anticuerpo–resto no proteináceo mueren.

B. Composiciones y métodos de recombinación.

Los anticuerpos pueden producirse empleando métodos de recombinación y composiciones, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567. En una forma de realización, se provee el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD79b descrito en la presente solicitud. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL, y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas liviana y/o pesada del anticuerpo). En una forma de realización adicional, se proveen uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una forma de realización adicional, se provee una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas formas de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido

nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una forma de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO, según su sigla en inglés) o célula linfóide (por ejemplo, una célula Y0, NS0, Sp20). En una forma de realización, se provee un método de preparación de un anticuerpo anti-CD79b, donde el método comprende el cultivo de una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se provee anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente, la recuperación del anticuerpo de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinada de un anticuerpo anti-CD79b, ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, es aislado e insertado en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unión específica a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo).

Las células huéspedes adecuadas para la clonación o expresión de vectores de codificación de anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en esta solicitud. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser producidos en bacterias, en particular, cuando la glicosilación y la función efectora Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.648.237,

5.789.199, y 5.840.523. (Ver, además, la referencia de Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245–254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede ser aislado de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble, y puede ser adicionalmente purificado.

Además de procariotes, los microbios eucariotes como los hongos filamentosos o las levaduras también son huéspedes adecuados para la clonación o expresión para vectores de codificación de anticuerpos, que incluyen cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación han sido “humanizadas” de modo de lograr la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver la referencia de Gerngross, *Nat. Biotech.*, 22: 1409–1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24: 210–215 (2006).

Las células huéspedes adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado son además derivadas de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de plantas también pueden utilizarse como huéspedes. Ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIESTM para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas).

Asimismo, pueden usarse las células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, las estirpes celulares de mamíferos que se adaptan para el desarrollo en suspensión pueden ser de utilidad. Otros ejemplos de líneas de células huéspedes mamíferas son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40

(COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describen, por ejemplo, en la referencia de Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, según su sigla en inglés); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en la referencia de Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243–251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de la rata Buffalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en la referencia de Mather *et al.*, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44–68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huéspedes mamíferas útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR⁻ CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y estirpes celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de ciertas líneas de células huéspedes mamíferas adecuadas para la producción de anticuerpos ver, por ejemplo, la referencia de Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255–268 (2003).

C. Ensayos.

Los anticuerpos anti-CD79b proporcionados en esta solicitud pueden identificarse, someterse a la detección sistemática o caracterizarse a fin de establecer sus propiedades físicas y químicas, y/o sus actividades biológicas, por medio de diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es evaluado a fin de establecer su actividad de unión de antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para la identificación de un anticuerpo que compite con un anticuerpo anti-CD79b descrito en la presente solicitud, por la unión a CD79b. En ciertas formas de realización, dicho anticuerpo de competición se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o de conformación) que es ligado por un anticuerpo anti-CD79b descrito en la presente solicitud. Los métodos ejemplares detallados para la cartografía de un epítipo al cual se une un anticuerpo se proporcionan en la referencia de Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, se incubaba CD79b inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a CD79b (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD79b descrito en la presente solicitud) y un segundo anticuerpo no marcado que es evaluado para establecer su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a CD79b. El segundo anticuerpo puede presentarse en un sobrenadante de hibridoma. Como un control, se incubaba CD79b inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Luego de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a CD79b, el exceso de anticuerpo no ligado es eliminado, y se mide la cantidad de marca asociada con CD79b inmovilizado. Si la cantidad de marca asociada con CD79b inmovilizado es sustancialmente menor en la muestra de ensayo, en relación con la muestra de control, entonces esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión a CD79b. Ver la referencia de Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad.

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de anticuerpos anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/ CD3) que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad para inhibir la proliferación o el crecimiento celular (por ejemplo, actividad de “muerte celular”), la capacidad para inducir la muerte celular, que incluye la muerte celular programada (apoptosis), o la actividad de unión de antígeno. Se proporcionan, además, anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En algunas formas de realización, la actividad comprende la capacidad de soportar la muerte de células B y/o la activación de las células T citotóxicas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) de la invención es ensayado a fin de establecer dicha muerte de células B y/o la activación del efecto citotóxico de la actividad biológica de células T por cualquiera de los métodos descritos en esta solicitud, en particular, en los ejemplos. En algunas formas de realización de cualquiera de estos ensayos de actividad, pueden aislarse PBMC de sangre entera de donantes sanos, por separación de Ficoll. En particular, puede recogerse sangre humana en jeringuillas heparinizadas, y aislarse las PBMC usando Leucosep y Ficoll Paque Plus. Si es necesario, pueden separarse células T CD4+ y T CD8+ con equipos Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente, pueden lavarse las células con medio RPMI que contiene 10% FBS (suero bovino fetal, conforme a sus siglas en inglés), suplementado con GlutaMax, penicilina & estreptomicina, y se agregan ~0.2 millones de células suspendidas a una placa de 96 receptáculos de base U. Las células pueden ser cultivadas en medio RPMI1640 suplementado con 10% FBS a 37°C en una incubadora de cultivo de células convencional humedecida. Para los ensayos de

muerte de células BJAB, pueden incubarse 20.000 células BJAB con células efectoras, o bien como huPBMC, o como células T purificadas, como las relaciones indicada por ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB, durante 24 horas. Para los ensayos de muerte de célula B endógena, pueden incubarse 200.000 huPBMC con diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas.

Luego del cultivo, las células pueden lavarse con regulador FACS (0.5% BSA, 0.05% Na Azida en PBS). Las células pueden entonces ser teñidas con regulador FACS, lavadas con regulador FACS, y suspendidas en 100 ul de regulador FACS que contiene 1 ug/ml de yoduro de propidio. Pueden recogerse los datos en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizarse usando un instrumento FlowJo. Las células B vivas pueden salir como células B PI-CD19+ o PI-CD20+ por FACS, y puede obtenerse el recuento de células absoluto con cuentas FITC agregadas a la mezcla de reacción como control de recuento interno. El % de la muerte celular puede calcularse sobre la base de controles tratados sin TDB. Las células T activadas pueden ser detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25 usando anti-CD69-FITC y anti-CD25-PE.

D. Inmunoconjugados.

La invención además provee inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD79b de la presente invención, conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como fármacos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta, o animal, o sus fragmentos), o isótopos radiactivos.

En una forma de realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, conforme a sus siglas en inglés) en el cual un anticuerpo es conjugado a uno o más fármacos, que incluyen, sin limitación, un

maitansinoide (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como los restos de fármacos de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una caliquemicina o su derivado (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336–3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2925–2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver las referencias de Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13: 477–523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16: 358–362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717–721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829–834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529–1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336–4343 (2002); y Patente de los Estados Unidos Nro. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo, como es descrito en esta solicitud, conjugado con una toxina enzimáticamente activa, o su fragmento, que incluye, sin limitación, toxina de difteria cadena A, fragmentos activos no ligantes de toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP–S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaaria Officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra forma de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo, como se describe en esta solicitud, conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Pueden obtenerse una diversidad de isótopos

radiactivos para la producción de radioconjugados. Ejemplos abarcan At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleo, por ejemplo, Tc^{99} o I^{123} , o una marca espín, para la imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen de resonancia magnética IRM), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio benzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en la referencia de Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO 94/11026. El conector puede ser un “conector dissociable”, que facilita la liberación de un agente citotóxico en la célula. Por ejemplo, pueden usarse un conector lábil al ácido, conector sensible a la peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo, o conector que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos Nro. 5.208.020).

Los inmunuconjugados o ADC de la presente invención contemplan, expresamente, sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos entrecruzadores, que incluyen, sin limitación, 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 pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección.

En un aspecto, los anticuerpos anti-CD79b de la invención son útiles para la detección de la presencia de CD79b en una muestra biológica. El término “detección”, de acuerdo con la presente solicitud, contempla la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una “muestra biológica” comprende una célula o un tejido. En ciertas formas de realización, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan CD79b en altos niveles en relación con otros tejidos, por ejemplo, células B y/o tejidos asociados con células B.

En una forma de realización, se provee un anticuerpo anti-CD79b para el uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se provee un método de detección de la presencia de CD79b en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende el contacto de la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD79b, como se describe en la presente solicitud, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-CD79b a CD79b, y la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD79b y CD79b. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, se usa un anticuerpo anti-CD79b para la selección de sujetos apropiados para la terapia con un anticuerpo anti-CD79b, por ejemplo, donde CD79b es un biomarcador para la selección de pacientes.

Ejemplos de trastornos proliferativos celulares que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen un trastorno de células B y/o un trastorno proliferativo de células B que incluye, sin limitación, linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células de manto.

Pueden usarse ciertos otros métodos para la detección de la unión de anticuerpos anti-CD79b a CD79b. Dichos métodos incluyen, sin limitación, ensayos de unión de antígeno bien conocidos en la técnica, tales como *western blots*, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima, conforme a sus siglas en inglés), inmunoensayos “de intercalación”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, e inmunohistoquímica (IHC).

En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-CD79b marcados. Las marcas incluyen, sin limitación, marcas o restos que son detectados directamente (tales como marcas fluorescentes, cromóforas, de densidad electrónica, quimioluminescentes y radiactivas), al igual que restos, tales como enzimas o ligandos, que son detectados indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Ejemplos de marcas incluyen, sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano rusticano (HRP, según su sigla en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa,

galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno a fin de oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa; biotina/avidina, marcas espín, marcas de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas.

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD79b como se describe en la presente solicitud se preparan por medio de la mezcla de dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado, con uno o más portadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition*, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores, en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, sin limitación: reguladores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); polipéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como

polietilenglicol (PEG). Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables en esta invención además incluyen agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasa neutras–activas solubles (sHASEGP, por sus siglas en inglés), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH–20 humanas solubles, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGPs y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Ejemplos de formulaciones de anticuerpos liofilizadas se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen aquellas que se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.171.586 y WO 2006/044908, donde estas últimas formulaciones incluyen un regulador de histidina–acetato.

Las formulaciones de la presente invención además pueden contener más de un compuesto activo, según lo necesario para la indicación particular tratada, preferentemente, aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti–CD79b, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti–CD79b, que se une a un epítipo diferente en el polipéptido CD79b, o un anticuerpo para algún otro blanco, tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del cáncer particular. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas se presentan adecuadamente en combinación en cantidades eficaces para el propósito propuesto.

Los ingredientes activos también pueden presentarse encerrados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por medio de la polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en la referencia *Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition*, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden formularse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, donde las matrices se presentan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas.

Las formulaciones por ser usadas en la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse sin dificultad, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos terapéuticos y composiciones.

Cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/ CD3) provisto en la presente solicitud puede usarse en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/ CD3) para el uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se provee un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/ CD3) para el uso en el tratamiento o la demora del avance de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o enfermedad proliferativa de células B). En ciertas formas de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo anti-CD79b/anticuerpo anti-CD3

biespecífico) para el uso en un método de tratamiento. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) para el uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular, que comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3). En una de dichas formas de realización, el método adicionalmente comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En adicionales formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) para el uso en el mejoramiento de la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) para el uso en un método de mejoramiento de la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular, que comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) para activar células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células CD8+ y/o CD4+ T), expandir (incrementar) una población de células efectoras, y/o matar una célula objetivo (por ejemplo, célula B objetivo). Un “individuo” de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3)) en la elaboración o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o trastorno proliferativo de células B). En una forma de realización adicional, el medicamento es para el uso en un método de tratamiento de un trastorno

proliferativo celular, que comprende la administración a un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular, de una cantidad eficaz del medicamento. En una de dichas formas de realización, el método adicionalmente comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En una forma de realización adicional, el medicamento es para la activación de células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células T CD8+ y/o CD4+), la expansión (el aumento) de una población de células efectoras, y/o la muerte de células objetivo (por ejemplo, células B objetivo) en el individuo. En una forma de realización adicional, el medicamento es para el uso en un método de mejoramiento de la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular o un trastorno autoinmunitario, que comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz del medicamento para activar células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células T CD8+ y/o CD4+), expandir (aumentar) una población de células efectoras, y/o matar una célula blanco objetivo (por ejemplo, célula B objetivo). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, cáncer y/o trastorno proliferativo de células B). En una forma de realización, el método comprende la administración a un individuo que tiene dicho trastorno proliferativo celular, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3). En una de dichas formas de realización, el método adicionalmente comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las anteriores formas de realización puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para mejorar la función inmunitaria en un individuo que tiene un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el método comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) a fin de activar células efectoras (por ejemplo, células T, por ejemplo, células T CD8+ y/o CD4+), expandir (incrementar) una población de células efectoras, y/o matar una célula objetivo (por ejemplo, célula B objetivo). En una forma de realización, un “individuo” es un humano.

Un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) de la invención puede usarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para la inhibición del crecimiento o la proliferación celular, *in vivo* o *in vitro*, donde el método comprende la exposición de una célula a un anticuerpo anti-CD79b en condiciones que permiten la unión a CD79b. La “inhibición del crecimiento o la proliferación celular” significa la disminución de la proliferación o el crecimiento de una célula por lo menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 100%, e incluye la inducción de 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 xenoinjerto, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente solicitud.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) de la invención se usa para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo celular se asocia con la mayor expresión y/o actividad de CD79b. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B se asocia con la mayor expresión de CD79b sobre la superficie de una célula B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un tumor o

un cáncer. Ejemplos de trastornos proliferativos de células B por tratar con los anticuerpos de la invención incluyen, sin limitación, linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células de manto. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un anti-CD79b inmunoconjugado (por ejemplo, inmunoconjugado anti-CD79b MMAE).

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) provisto en esta solicitud, *por ejemplo*, para el uso en cualquiera de las anteriores métodos terapéuticos. En una forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b provistos en esta solicitud y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) provisto en esta solicitud y por lo menos un agente terapéutico adicional, *por ejemplo*, como se describe a continuación.

En una forma de realización, la enfermedad proliferativa de células B incluye, sin limitación, linfomas (por ejemplo, linfomas no hodgkinianos (NHL) de células B) y leucemias linfocíticas. Dichos linfomas y leucemias linfocíticas incluyen, por ejemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células no disociadas pequeñas/ linfoma de Burkitt (que incluye linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico y linfoma no Burkitt), c) linfomas de zona marginal (que incluyen linfoma de células B de zona marginal extranodales (linfomas de tejido linfático asociados con la mucosa, MALT), linfoma de células B de zona marginal

nodales y linfoma de zona marginal esplénico), d) linfoma de células de manto (MCL), e) linfoma de células grandes (que incluyen linfoma de células grandes difusas de células B (DLCL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma de células mixtas difusas, linfoma inmunoblástico, linfoma de células B mediastinales primarias, linfoma de células B pulmonares – linfoma angiocéntrico), f) tricoleucemia, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, i) neoplasmas celulares plasmáticos, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmacitoma, y/o j) enfermedad de Hodgkin.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el trastorno proliferativo de células B es cáncer. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), o linfoma de células de manto. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es NHL, tal como NHL inactivo y/o NHL agresivo. En algunas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es linfoma folicular inactivo o linfoma de células B grandes difuso. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un inmunoconjugado anti-CD79b (por ejemplo, inmunoconjugado anti-CD79b MMAE).

Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser coadministrado con por lo menos un agente terapéutico adicional y/o agente complementario. 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 dichas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CHP, CVP, o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®), donde la terapia de combinación es útil en el tratamiento de cáncer y/o trastornos de células B tales como trastornos proliferativos de células B, que incluyen linfoma, linfoma no hodgkiniano (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo de recaída, NHL inactivo de recaída, NHL resistente, NHL inactivo resistente, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, tricoleucemia (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células de manto. En otras formas de realización, por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser coadministrado con por lo menos un agente terapéutico adicional. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico, agente usado en la terapia de radiación, agente antiangiogénico, agente apoptótico, agente antitubulinario, u otro agente, tal como un antagonista del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesilato)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferón, citoquina, anticuerpo diferente del anticuerpo anti-CD3 de la invención, tal como un anticuerpo que se une a uno o más de los siguientes objetivos: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA VEGF, o receptores VEGF, TRAIL/Apo2, u otro agente bioactivo u orgánico químico.

En algunas formas de realización, los métodos pueden comprender adicionalmente una terapia adicional. La terapia adicional puede ser terapia de radiación, cirugía, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, nanoterapia, terapia de anticuerpo monoclonal, o una combinación de los anteriores. La terapia adicional puede tener lugar en la forma de terapia complementaria o neocomplementaria. En algunas formas de realización, la terapia adicional es la administración de agente antimetastásico o inhibidor enzimático de molécula pequeña. En algunas formas de realización, la terapia adicional es la administración de agentes limitadores de efectos secundarios (por ejemplo, agentes propuestos para disminuir la aparición y/o gravedad de los efectos secundarios del tratamiento, tales como agentes contra las náuseas, etc.). En algunas formas de realización, la terapia adicional es la terapia de radiación. En algunas formas de realización, la terapia adicional es la cirugía. En algunas formas de realización, la terapia adicional es una combinación de terapia de radiación y cirugía. En algunas formas de realización, la terapia adicional es la irradiación gamma. En algunas formas de realización, la terapia adicional puede ser una administración separada de uno o más de los agentes terapéuticos que se describen con anterioridad.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, el agente terapéutico adicional es un glucocorticoide. En algunas formas de realización, el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisolona, prednisona, metilprednisona, triamcinolona, parametasona, betametasona, fludrocortisona y sus ésteres, sales y complejos farmacéuticamente aceptables. En algunas formas de realización, el glucocorticoide es dexametasona. En algunas formas de realización, el glucocorticoide es un éster farmacéuticamente aceptable, sal o complejo

farmacéuticamente aceptable de dexametasona. En algunas formas de realización, el glucocorticoide es dexametasona.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un anticuerpo anti-CD20. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo humanized B-Ly1. En algunas formas de realización, el anticuerpo humanizado B-Ly1 es obinituzumab. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD20 es ofatumumab, ublituximab, y/o ibritumomab tiuxetano.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un agente alquilante. En algunas formas de realización, el agente alquilante es ácido 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbencimidazol-2-il]butanoico y sus sales. En algunas formas de realización, el agente alquilante es bendamustina.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un inhibidor de BCL-2. En algunas formas de realización, el inhibidor de BCL-2 es 4-(4-[[2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil]piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahydro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrol-2-yl)piridin-5-il)benzamida y sus sales. En algunas formas de realización, el inhibidor de BCL-2 es venetoclax (CAS#: 1257044-40-8).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K). En algunas formas de realización, el inhibidor de PI3K inhibe la isoforma delta PI3K (es decir, P110δ). En algunas formas de realización, el inhibidor PI3K es 5-fluor-3-fenil-2-[[1S]-1-(7H-purin-6-ilamino)propil]-4(3H)-quinazolinona y sus sales. En algunas formas de realización, el inhibidor PI3K es idelalisib (CAS#: 870281-82-0).

6). En algunas formas de realización, el inhibidor PI3K inhibe las isoformas alfa y delta de PI3K. En algunas formas de realización, el inhibidor PI3K es 2-{3-[2-(1-Isopropyl-3-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenczo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il]-1H-pirazol-1-il}-2-metilpropanamida, y sus sales.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton. En algunas formas de realización, el inhibidor de BTK es 1-[(3R)-3-[4-Amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona y sus sales. En algunas formas de realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (CAS#: 936563-96-1).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende talidomida o uno de sus derivados. En algunas formas de realización, la talidomida o uno de sus derivados es (RS)-3-(4-Amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)piperidina-2,6-diona y sus sales. En algunas formas de realización, la talidomida o uno de sus derivados es lendalidomida (CAS#: 191732-72-6).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende uno o más de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, o prednisolona (CHOP). En algunas formas de realización, la terapia adicional adicionalmente comprende un anticuerpo anti-CD20 como se describe con anterioridad (por ejemplo, GA-101 y/o Rituxano).

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende uno o más de ciclofosfamida, doxorubicina, o prednisolona (CHP). En algunas formas de realización, la terapia adicional adicionalmente comprende un anticuerpo anti-CD20 como se describe con anterioridad (por ejemplo, GA-101 y/o Rituxano). En algunas formas de realización, la terapia adicional adicionalmente comprende un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y

fármaco. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco es anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco se describe en cualquiera de U. S. 8.088.378 y/o US 2014/0030280, que se incorporan por referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco es polatuzumab vedotina. En algunas formas de realización de cualquiera de los trastornos proliferativos de células B, el trastorno proliferativo de células B es resistente al tratamiento con un conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco (por ejemplo, conjugado de anticuerpo anti-CD79b MMAE fármaco). En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo anti-CD79b y fármaco es polatuzumab vedotina.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un antagonista de unión del eje PD-1. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un antagonista de la unión de PD-1. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un antagonista de la unión de PD-L1. En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, la terapia adicional comprende un antagonista de unión de PD-L2.

En algunas formas de realización de cualquiera de los métodos, un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, que incluye el medio parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como la inyección intravenosa o subcutánea, de acuerdo, en parte, con la administración, breve o crónica. Diversos programas de dosificación

que incluyen, sin limitación, administraciones únicas o múltiples, en diversos puntos de tiempo, la administración por bolo, y la infusión por pulsos, se contemplan en esta solicitud. En algunas formas de realización, la administración es subcutánea.

Los anticuerpos de la invención serán formulados, dosificados, y administrados de una forma consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores por considerar en este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el mamífero particular tratado, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no necesariamente debe ser formulado, si bien, opcionalmente lo es, con uno o más agentes actualmente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descriptos anteriormente. Estos son generalmente usados en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se describen en esta solicitud, o alrededor de 1 a 99% de las dosificaciones descriptas en esta solicitud, o en cualquier dosificación, y por cualquier vía que sea empírica o clínicamente determinada como apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad por tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, los antecedentes clínicos del paciente, y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo es

administrado adecuadamente al paciente en una sola vez, o en una serie de tratamientos.

Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) administrada al humano estará en el rango de alrededor de 0.01 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del paciente, en una o más administraciones. En algunas formas de realización, el anticuerpo usado es alrededor de 0,01 a alrededor de 45 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 35 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 0,01 a alrededor de 5 mg/kg, o alrededor de 0,01 a alrededor de 1 mg/kg administrados diariamente, por ejemplo. En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3) descrito en esta solicitud es administrado a un humano en una dosis de alrededor de 100 mg, alrededor de 200 mg, alrededor de 300 mg, alrededor de 400 mg, alrededor de 500 mg, alrededor de 600 mg, alrededor de 700 mg, alrededor de 800 mg, alrededor de 900 mg, alrededor de 1000 mg, alrededor de 1100 mg, alrededor de 1200 mg, alrededor de 1300 mg o alrededor de 1400 mg el día 1 de ciclos de 21 días. La dosis puede ser administrada como una sola dosis, o como múltiples dosis (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tales como infusiones. Para administraciones repetidas durante varios días o período mayor, de acuerdo con el trastorno, el tratamiento, en general, será sostenido hasta que se produce una supresión deseada de síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo se encontrará en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, puede administrarse al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, o 10 mg/kg (o

cualquiera de sus combinaciones). Dichas dosis pueden ser administradas en forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo tal que el paciente recibe de alrededor de dos a alrededor de veinte, o por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo anti-CD79b (por ejemplo, anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis menores. El avance de esta terapia es fácilmente monitoreado por ensayos y técnicas convencionales.

H. Artículos de fabricación.

En otro aspecto de la invención, se provee un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un rótulo o un prospecto sobre el recipiente o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados abarcan, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas para solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, en sí misma o combinada con otra composición, eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico del trastorno, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón para punción con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. El rótulo o el prospecto indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección elegida. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición allí contenida, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición allí contenida, donde la composición comprende un agente citotóxico u otro agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta forma de realización de la invención puede comprender,

asimismo, un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una afección particular. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación además puede comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, según su sigla en inglés), solución salina regulada con fosfato, solución de cloruro sódico compuesta o solución de dextrosa. Asimismo, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los anteriores artículos de fabricación puede incluir un inmunoconjugado de la invención, en lugar, o además, de un anticuerpo anti-CD79b.

III. EJEMPLOS.

Los que siguen son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden llevarse a la práctica diversas formas de realización adicionales, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1.

Materiales y métodos.

A. Generación de anticuerpo monoclonal.

Se generó proteína para la inmunización de ratones, mediante la transfección transitoria de vectores que expresan dominio extracelular (ECD) marcado con Fc o marcado con His de CD79b humano, en células CHO. Las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes de células transfectadas en columnas de proteína A, y la identidad de la proteína se confirmó por secuenciamiento N-terminal. Se hiperinmunizaron diez ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, Calif.) con ECD recombinado marcado con Fc o marcado con His de CD79b humano. Se fusionaron células B de ratones que

demostraban altas valoraciones de anticuerpo contra el inmunógeno CD79b humano por ELISA directo, y la unión específica a células Ramos, con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, Md.), como se describe previamente (Hongo, J. S. et al., *Hybridoma*, 14: 253–260 (1995); Kohler, G. et al., *Nature*, 256: 495–497 (1975); Freund, Y. R. et al., *J. Immunol.*, 129: 2826–2830 (1982)). Luego de 10 a 12 días, los sobrenadantes se cosecharon y se sometieron a la detección sistemática para establecer la producción de anticuerpo y la unión por ELISA directo y FACS, como se indica anteriormente. Los clones positivos, que mostraban la más alta inmunounión luego de la segunda ronda de subclonación por dilución de limitación, se expandieron y se cultivaron para la caracterización adicional, que incluyó la especificidad de CD79b humano y la reactividad cruzada. Los sobrenadantes cosechados de cada linaje de hibridoma se purificaron por la cromatografía de afinidad (cromatografía líquida de proteína veloz de Pharmacia (FPLC); Pharmacia, Uppsala, Suecia), como se describe previamente (Hongo, J. S. et al., *Hybridoma*, 14: 253–260 (1995); Kohler, G. et al., *Nature*, 256: 495–497 (1975); Freund, Y. R. et al., *J. Immunol.*, 129: 2826–2830 (1982)). Las preparaciones purificadas de anticuerpo entonces se filtraron por esterilización (0.2- μ m tamaño de poro; Nalgene, Rochester N. Y.) y se almacenaron a 4°C en solución salina regulada con fosfato (PBS).

B. Generación de TDB.

Los anticuerpos TDB se produjeron como anticuerpos de longitud completa en el formato de botón en agujero como IgG1 humano, como se describe previamente (Atwell et al. *J. Mol. Biol.* 270: 26–35, 1997). Mitades de anticuerpos fueron expresadas o bien en células de *E. coli* o de ovario de hámster chino (CHO, conforme a sus siglas en inglés), purificadas por cromatografía de afinidad de proteína A, y los pares de anticuerpos en mitades apropiados fueron anelados

in vitro como se describe previamente (Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 2013). Si la producción de anticuerpo TDB se llevaba a cabo en células CHO, el anticuerpo podía incluir una mutación de aglicosilación, por ejemplo, en el residuo N297 (por ejemplo, N297G), de modo tal que el anticuerpo TDB fuera una variante menos efectora e incapaz de iniciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

Después de la anelación (*annealing*: proceso de enfrentamiento y apareamiento de dos hebras de nucleótidos o parte de esas hebras), los anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3 se purificaron por medio de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), y se caracterizaron por filtración de gel analítica, espectrometría de masa y electroforesis de gel de poliacrilamida. Los anticuerpos purificados corrieron como un solo pico (>99% de la señal) en la filtración de gel, con menos de 0,2% de agregados. No se detectaron homodímeros por la espectrometría de masa.

C. Afinidad de unión.

Las afinidades de unión para cada uno de los TDB CD3/CD79b se evaluaron por el análisis Biacore o FACS. En síntesis, para los ensayos de unión Biacore, se inmovilizó CD3 γ humano en un chip sensor Biacore Series S CM5 usando el equipo de acoplamiento de amina de Biacore, y los anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3 o sus variantes Fab se encontraban en el flujo transversal. Para los ensayos de unión FACS, las células BJAB (para antígenos de células B) u otras estirpes celulares según lo especificado se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpos TDB a 4°C durante 30 minutos; luego, las células se lavaron y se incubaron con 2^{do}. anticuerpo (anti-hulIgG-PE; BD Bioscience) durante otros 15 minutos, antes de que las células se lavaran nuevamente y estuvieran listas para el análisis FACS.

D. Ensayo de muerte de células B in vitro y de activación de células T.

Los anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3 generados se ensayaron a fin de establecer su capacidad para soportar la muerte de células B y la activación de células T citotóxicas. En estos ensayos, se aislaron PBMC de sangre entera de donantes sanos, por medio de la separación de Ficoll. En síntesis, se recogió sangre humana en jeringuillas heparinizadas, y se aislaron las PBMC usando Leucosep (Greiner Bio-one, cat. # 227290P) y Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, cat. # 95038-168), según lo recomendado por el fabricante. Si fue necesario, las células CD4+T y CD8+T se separaron con equipos Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células se lavaron en medio RPMI que contenía 10% FBS, suplementado con GlutaMax (Gibco, cat#35050-061), penicilina & estreptomicina (Gibco, cat. # 15140-122) y se agregaron ~0,2 millones de células suspendidas a una placa de base U de 96 receptáculos. Las células se cultivaron en RPMI1640 suplementado con 10%FBS (Sigma-Aldrich) a 37°C en una incubadora de cultivo de células convencional humedecida. Para los ensayos de muerte de células BJAB, se incubaron 20.000 células BJAB con células efectoras, o bien como huPBMC o como células T purificada, como relaciones indicadas por ensayo, en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos TDB durante 24 horas, a menos que se especifique lo contrario. Para los ensayos de muerte de célula B endógena, se incubaron 200.000 huPBMC con diversas concentraciones de anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3 durante 24 horas, a menos que se especifique lo contrario.

Luego del cultivo, las células se lavaron con regulador FACS (0,5% BSA, 0,05% Na Azida en PBS). Las células luego se tiñeron con regulador FACS, se lavaron con regulador FACS y se suspendieron en 100 ul de regulador FACS que contenía 1 ug/ml de yoduro de propidio. Los datos se recogieron en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron usando FlowJo. Las células B vivas salieron

como células B PI-CD19+ o PI-CD20+ por FACS, y se obtuvo el recuento de células absoluto con cuentas FITC agregadas a la mezcla de reacción como control de recuento interno. El % de la muerte celular puede calcularse sobre la base de controles tratados sin TDB. Las células T activadas pueden ser detectadas por la expresión de superficie de CD69 y CD25 usando anti-CD69-FITC (BD, cat. # 555530) y anti-CD25-PE (BD, cat. #555432).

D. Eficacia in vivo.

Se inocularon 50 ratones SCID.bg con 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1 en HBSS (solución salina balanceada de Hanks, conforme a sus siglas en inglés), por vía subcutánea, en un volumen de 0,2 ml por ratón, en el unilateral-torácico derecho (sin exceder 200 ul), o una mezcla de 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1 y 10 millones de PBMC en HBSS a un volumen de 0,2 ml (sin exceder 200 ul). Este fue un estudio preventivo, de modo que la inoculación y el tratamiento se administraron el Día 0.

Había cinco grupos de estudio: 1) 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1, vehículo, qwx2, IV; 2) 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1, 0,5 mg/kg TDB anti-CD79, qwx2, IV; 3) 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1 + 10×10^6 PBMC (premezcladas), vehículo, qwx2, IV; 4) 5 millones de células BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1 + 10×10^6 PBMC (premezclas), 0,5 mg/kg TDB anti-CD79 (CD79b.A7.v14b/38E4v1), qwx2, IV; y 5) 5 BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE resistentes modelo T1.1 X1, 8 mg/kg BJAB-luc anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE, una vez, IV. Las PBMC fueron de Buffy Coat Donor, cultivadas durante la noche en condición no activante, inoculadas como una mezcla con las células

BJAB. Todos los tratamientos se administraron i. v., en la vena de la cola, volumen = 0,1 ml (sin exceder 200 μ l). Los tumores se midieron 1–2 veces por semana. Se midieron los pesos corporales 1–2x/semana hasta 14 días, luego del tratamiento final.

1. Selección de rama de antígeno CD79b TDB–anti–CD79b.

Se han generado conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC) (tales como el anticuerpo humanizado anti–CD79b (SN8 humanizado) conjugado con monometilauristatina E (MMAE) por un conector dissociable por proteasa), que ha demostrado, en la clínica, ser eficaz para el tratamiento de NHL. Ver Patente de los Estados Unidos Nro. 8.088.378 y Morschhauser et al., “4457 Updated Results of a Phase II Randomized Study (ROMULUS) of Polatuzumab Vedotin or Pinatuzumab Vedotin Plus Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory Non–Hodgkin Lymphoma” 56th ASH Annual Meeting and Exposition: December 6–9, 2014.

Sobre la base del éxito clínico del ADC anti–CD79b, el anticuerpo humanizado SN8 se presentó en un formato de anticuerpo biespecífico dependiente de células T (TDB) a fin de utilizar el alto potencial citotóxico de las células T en la erradicación de células tumorales. Ver Patente de los Estados Unidos Nro. 8.088.378, incorporada en esta solicitud por referencia en su totalidad. Se generó un anti–CD3 (por ejemplo, UCHT1.v9; ver, por ejemplo, Zhu et al. *Int. J. Cancer* 62: 319–324 (1995))/anti–CD79b (por ejemplo, SN8.v28) biespecífico de botón & agujero (K&H) como se describe con anterioridad. Sin embargo, en el ensayo de muerte de célula B endógena usando dos diferentes donantes como se describe con anterioridad, se observó escasa actividad de muerte de células B para el K&H biespecífico UCHT1.v9/ SN8.v28: el valor EC₅₀ fue de 357 ng/ml, y 120 ng/ml, el ensayo de muerte celular.

Un segundo TDB anti-CD3 (por ejemplo, UCHT1.v9)/anti-CD79b se generó usando 2F2 como la rama de anticuerpo anti-CD79b. 2F2 había demostrado promesa *in vitro* como un ADC anti-CD79b. Ver, por ejemplo, US 20090068202, incorporada por referencia en su totalidad. Además, el anticuerpo de rama CD79b SN8.v28 fue modificado en un intento por mejorar la muerte celular (SN8.new (VH SEQ ID NO: 37 y VL SEQ ID NO: 38)). Como se muestra en la Figura 1A (ensayo de muerte de célula B endógena) y en la Figura 1B (ensayo de muerte celular BJAB), los anticuerpos K&H biespecíficos SN8.v28/UCHT1.v9, los anticuerpos K&H biespecíficos SN8.new/UCHT1.v9, al igual que los anticuerpos K&H biespecíficos 2F2/UCHT1.v9 lograron deficiente actividad de muerte de células B.

Se generaron anticuerpos monoclonales anti-CD79b como se describe anteriormente. Dos de estos anticuerpos anti-CD79b (CD79b.F6 y CD79b.A7) se ensayaron también como anticuerpos de formato bisfab biespecíficos anti-CD79b/CD3. Como se expone en la Figura 1C, en un ensayo de muerte de célula B endógena, el CD79b.F6/UCHT1.v9 bisfab biespecífico exhibió mejorada muerte de células B en comparación con K&H SN8.v28/UCHT1.v9 biespecífico (EC_{50} de 33 ng/ml en comparación con 189 ng/ml). Adicionalmente, como se muestra en la Figura 1C, en el ensayo de muerte de célula B endógena, el bisfab biespecífico CD79b.A7/UHT1.v9 mejoró drásticamente la muerte de células B en comparación o bien con bisfab biespecífico CD79b.F6/UCHT1.v9 o K&H biespecífico SN8.v28/UCHT1.v9 (EC_{50} 12 ng/ml en comparación con 33 ng/ml y 189 ng/ml). El CD79b.A7/UHT1.v9 bisfab biespecífico fue adicionalmente ensayado para determinar la muerte de célula B endógena y la activación de células T CD8+ usando donantes adicionales. Como se muestra en las Figuras 2A y C, en el ensayo de muerte de célula B endógena que se describe anteriormente, el bisfab biespecífico CD79b.A7/UHT1.v9 usando dos diferentes donantes produjo la

eficiente muerte de células B, con un EC_{50} de 7.0 ng/ml y 18 ng/ml, respectivamente. Al mismo tiempo, como se muestra en las Figuras 2B y D, en el ensayo de activación de células T CD8⁺ que se describe anteriormente, el bisfab biespecífico CD79b.A7/UHT1.v9 logró la eficiente activación de células T, según lo evidenciado por el % de células T CD69+CD25⁺ en células T CD8⁺ con un valor EC_{50} de 17 ng/ml y 17 ng/ml, respectivamente.

A fin de comprender mejor la diferencia en la muerte de células B y la activación de células T de las diferentes ramas de antígeno anti-CD79b en los anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3, se analizaron las propiedades de las diferentes ramas de antígeno anti-CD79b. La unión de CD79b.A7 a células BJAB en un ensayo FACS fue desafiada por un péptido de 21 aminoácidos ARSEDRYRNPKGSAACSRIWQS (SEQ ID NO: 63) que corresponde a los términos NH₂ de huCD79b, si bien no por el péptido de 21 aminoácidos AKSEDLYPNPKGSAACSRIWQS (SEQ ID NO: 64) que corresponde a los términos NH₂ de cinoCD79b (datos no expuestos). Estos resultados son similares a los resultados de 2F2 y SN8 que se describen en la referencia de Zheng et al. *Mol. Cancer Ther.* 8 (10): 2937–2947 (2009). Por lo tanto, el epítipo en CD79b no parece representar la diferencia en la muerte de células B y la activación de células T entre SN8.v28/UCHT1.v9, 2F2/UCHT1.v9 y CD79.A7.

Se evaluó además la afinidad de unión de anticuerpo monovalente y bivalente anti-CD79b a fin de comprender mejor la contribución, si la hay, a la actividad de muerte de células B. Se analizó también la afinidad de unión de anticuerpos de rama dual, bivalentes, anti-CD79b y anticuerpos biespecíficos anti-CD79b/CD3 usando células BJAB. Los experimentos iniciales indicaron que la afinidad de unión por EC_{50} en la célula BJAB del anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b SN8.v28 fue 0,04 µg/ml, mientras que la afinidad de unión por EC_{50} en célula BJAB del K&H biespecífico anti-CD79b/CD3 (SN8.v28/UCHT1.v9)

fue solo de 3,7 $\mu\text{g/ml}$. De manera similar a la que se expone en la Figura 3A, la afinidad de unión por EC_{50} en la célula BJAB del anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b 2F2 fue significativamente más alta que aquella del K&H biespecífico anti-CD79b/CD3 (SN8.v28/UCHT1.v9, SN8new/UCHT1.v9, y 2F2/UCHT.v9). La afinidad de unión de los anticuerpos adicionales anti-CD79, CD79b.F6 y CD79b.A7, se evaluó en el formato de anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b, al igual que los anticuerpos bisfab y K&H biespecíficos anti-CD79b/ CD3. Como se muestra en la Figure 3B, la afinidad de unión del anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b CD79.A7 por EC_{50} en la célula BJAB fue de 0,31 $\mu\text{g/ml}$. La afinidad de unión por EC_{50} en la célula BJAB del anti-CD79b/CD3 bisfab biespecífico (CD79b.A7/UCHT1.v9) fue menor que el anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b CD79.A7, si bien aún relativamente alto, de 1,4 $\mu\text{g/ml}$. La afinidad de unión por EC_{50} en célula BJAB del anticuerpo bivalente de rama dual anti-CD79b CD79b.F6 y los anticuerpos K&H y bisfab biespecífico anti-CD79b/ CD3 (SN8.v28/UCHT1.v9 y CD79b.F6/UCHT1.v9, respectivamente) fue significativamente inferior. Sobre la base de esta información, la afinidad de unión monovalente se correlacionó con el alcance de la reducción de células B endógenas y el % de muerte de células B.

2. Humanización de rama de anti-CD79b antígeno.

Se humanizó anticuerpo monoclonal CD79b.A7 como se describe con anterioridad. Los números de residuos son de acuerdo con Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed.*, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

Las variantes construidas durante la humanización de CD79b.A7 se evaluaron en la forma de un IgG. Los dominios VL y VH de CD79b.A7 murino se alinearon con las secuencias de consenso VL humana kappa II (VLK2) y VH humana subgrupo I (VHI). Las regiones hipervariables de los anticuerpos murinos

se diseñaron como marcos aceptores VLK2 y VHI. Específicamente, a partir del dominio muCD79b.A7, las posiciones 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) se injertaron en VLK2, y a partir del dominio muCD79b.A7 VH α , se injertaron las posiciones 26–35 (H1), 50–65 (H2) y 93–102 (H3) en VHI.

La afinidad de unión de los anticuerpos en esta sección se determinó por BIAcore™ T100. En síntesis, se activaron chips CM5 de grado de investigación BIAcore™ con reactivos de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se acopló CD79a humano fusionado con un dominio Fc en el término C a los chips. A fin de lograr más eventos de unión monovalente, se inmovilizó a baja densidad de ~12 unidades de respuesta (UR) en cada celda de flujo. Para la medición de la afinidad aparente de los anticuerpos, se inmovilizaron ~ 370 UR del antígeno. Los grupos de acoplamiento no reaccionados se bloquearon con 1 M etanolamina. Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones seriales triples de anticuerpo en regulador PBS–T (0,05% surfactante P20 en PBS) a 25° C, con un caudal de 30 μ l/min. Se usó 10 mM glicina, pH 1,7, como regulador de regeneración con un caudal de 30 μ l/min durante 1 minuto. Los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión 1:1 de Langmuir (BIAcore™ T100 Evaluation Software versión 2.0). Se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_d) como la relación k_{off}/k_{on} .

El injerto de CDR humanizado de CD79b.A7 (CD79b.A7.v1) no se unió a CD79b. Por lo tanto, se prepararon variantes humanizadas adicionales a fin de evaluar la contribución de las posiciones vernier de marco de ratón, a la unión. Seis cadenas livianas adicionales (VL1: Injerto de CDR + (Y36L), VL2: Injerto de CDR + (Y36L + L46C), VL3: Injerto de CDR + (I2V + Y36L + L46C), VL4: Injerto de CDR + (Y36L + L46S), VL5: Injerto de CDR + (I2V + Y36L + L46S), VL6: Injerto de CDR + (L46S)) y siete cadenas pesadas adicionales (VH1a: Injerto de CDR +

(A93S), VH1b: Injerto de CDR + (R71V + A93S), VH1c: Injerto de CDR + (V67A + I69L + R71V + A93S), VH1d: Injerto de CDR + (V67A + I69L + R71V + T73K + A93S), VH1e: Injerto de CDR + (V67A + R71V + A93S), VH1f: Injerto de CDR + (I69L + R71V + A93S), y VH1g: Injerto de CDR + (V67A + I69L)) se construyeron y se combinaron para generar las variantes de la Tabla 2. Sobre la base de las afinidades de estas variantes, Y36L y L46C en la cadena liviana parecen ser los residuos clave de vernier de ratón. De manera sorprendente, cuando la posición 46 fue cambiada a una serina a fin de evitar el uso de una cisteína libre, la afinidad de las variantes con este cambio mejoró drásticamente. En la cadena pesada, V67A, I69L, R71V y A93S también contribuyeron a la unión de CD79b; sin embargo, R71V pareció ser el residuo vernier de ratón clave sobre la base de este análisis mutacional. Las afinidades que se exponen en la Tabla 2 son todas afinidades aparentes sobre la base de la unión bivalente de IgG a CD79b inmovilizado a una baja densidad para la aproximación de la unión monovalente. Ver Tabla 2 a continuación.

Tabla 2.

CD79b.A7 nM	injerto K2	VL1	VL2	VL3	VL4	VL5	VL6
injerto VH1	v1 Sin unión	v2 NDB	v3 320 nM				
VH1a	v4 NDB	v5 NDB	v6 3800 nM				
VH1b	v7 NDB	v8 NDB	v9 7050 nM		v27 8 nM		
VH1c	v10 NDB	v11 NDB	v12 20 nM	v13 716 nM	v14 5 nM	v15 5 nM	v26 23 nM
VH1d			v16 117 nM	v17 88 nM	v18 4 nM	v19 4 nM	
VH1e					v20 8 nM		v23 20 nM
VH1f					v21 8 nM		v24 39 nM
VH1g					v22 16 nM		v25 68 nM

La afinidad de unión fue adicionalmente evaluada por el análisis FACS. Se incubaron células BJAB con diversos anticuerpos anti-CD79b durante 30 minutos

en hielo. Al final de la incubación, las células se lavaron con regulador helado de FACS (1x PBS, 2% BSA, 2 mM EDTA), seguido de la incubación con anticuerpo IgG antihumano de ratón marcado con PE (BD Bioscience #555787). El análisis de citometría de flujo se realizó en un instrumento de análisis BD LSR. La unión bivalente fue expresada como la media de intensidad de fluorescencia (MFI, conforme a sus siglas en inglés) de fluoróforo PE. La unión de chCD79b.A7, huCD79b.A7.v12 y huCD79b.A7.v14 a células BJAB–luciferasa fue con un valor EC_{50} de 124 ng/ml, 400 ng/ml y 68 ng/ml, respectivamente.

La afinidad de unión del CD79.A7.v14 humanizado, de monovalente y bivalente, se evaluó como se describe con anterioridad. Como se muestra en la Figura 3C, el CD79.A7.v14 monovalente (en el formato TDB K&H CD79.A7.v14/40G5c) tuvo un valor EC_{50} de 220 ng/ml, mientras que el CD79A7.v14 de rama dual bivalente tuvo un valor EC_{50} de 46,8 ng/ml.

El anticuerpo humanizado CD79.A7.v14 se ensayó en condiciones de estrés térmico (40°C, pH 5.5, 2 semanas) y el análisis de clorhidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH). Las muestras se sometieron a estrés térmico a fin de imitar la estabilidad de vida útil del producto. Las muestras se sometieron al intercambio de regulador en 20 mM His Acetato, 240 mM sucrosa, pH 5,5, y se diluyeron hasta una concentración de 1 mg/ml. Un ml se muestra se sometió a un estrés a 40°C durante 2 semanas, y un segundo se almacenó a -70°C como un control. Ambas muestras entonces fueron digeridas usando tripsina a fin de crear péptidos que podrían ser analizados usando el análisis de cromatografía líquida (LC) – espectrometría de masa (MS). Para cada péptido en el tiempo de retención de la muestra, se adquirió la información de la LC, al igual que de la masa exacta de alta resolución y la fragmentación de ión péptido (información de secuencia de aminoácidos) en la MS. Se tomaron los cromatogramas de ion extraído (XIC) para los péptidos de interés (iones péptidos nativos y modificados) de los grupos de

datos, en una ventana de ± 10 ppm, y los picos se integraron al área de determinación. Se calcularon los porcentajes relativos de modificación para cada muestra, tomando el (área del péptido modificado) dividido por el (área del péptido modificado más el área del péptido nativo) multiplicado por 100.

W33 en CDR-H1 y M62 en CDR-H2 de CD79b.A7.v14 demostró ser sensible a la oxidación (la oxidación de W33 aumentó el 73,7%, y la oxidación de M62 aumentó el 64.8%). Las variantes de los anticuerpos CD79b.A7.v14 se ensayaron a fin de determinar si el potencial de oxidación podría ser reducido sin afectar la unión a huCD79b. La variante, CD79b.A7.v14b, eliminó estos problemas de oxidación potencial al cambiar estas regiones de modo de hacer coincidir el consenso humano VH1 (W33Y, M62K, K64Q y D65G). Estos cambios no alteraron la afinidad para la unión de CD79b. Ver los datos no expuestos.

3. Selección de rama de CD79b TDB-anti-CD3 antígeno.

Se analizó el efecto del emparejamiento del dominio de unión CD3 sobre la eficiencia de la muerte de células B del anticuerpo TDB anti-CD79b. Se ensayó el anticuerpo anti-CD79b.A7.v14 en combinación con diferentes dominios de unión de anticuerpo anti-CD3 que incluyeron 40G5c y 38E4v1. Se incubaron 200.000 PBMC con o sin anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 durante 48 horas. El porcentaje de muerte de células B en la Figura 5A se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$. La activación de células T como se muestra en la Figura 5B se midió mediante la entrada en células CD69⁺/CD25⁺ en la población de células T CD8⁺. Como se muestra en la Figura 5A y B, K&H CD79b.A7.v14/40G5c mostró escasa activación de T CD8⁺ y bajo porcentaje de muerte de célula B endógena. En experimentos adicionales (datos no expuestos), el anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14/40G5c K&H) mostró un valor EC₅₀ de 1.1 y 2.3 ng/ml para la activación de T CD8⁺ y un valor EC₅₀ de 2658 y

288 ng/ml para la muerte de célula B endógena usando dos diferentes donantes. En contraste, como se muestra en la Figura 5A y B, el anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14/38E4v1 K&H) mostró sustancialmente mejorada activación de células T CD8+ y porcentaje de muerte de célula B endógena –un valor EC_{50} de 15 ng/ml para la muerte de célula B endógena en comparación con CD79b.A7.v14/40G5c K&H. En adicionales experimentos (datos no expuestos), el anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14/40G5c K&H) mostró un valor EC_{50} de 401, 14, 1,5, 10, 12, y 16 ng/ml para la muerte de célula B endógena usando seis diferentes donantes.

La muerte de células B y la actividad de activación de células T del anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14/40G5c K&H) se ensayaron además en estirpes celulares BJAB y WSU-DLCL2 como se describe anteriormente, y en la Figura 6, Leyenda de la Figura. Como se muestra en la Figura 6A y B, el anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14/40G5c K&H) mostró significativa activación de T CD8+ y porcentaje de muerte de células B –un valor EC_{50} de 85 ng/ml para muerte de células B BJAB, y 82 ng/ml, para muerte de células B WSU-DLCL2. El valor EC_{50} para la activación de células T CD8+ con células BJAB y WSU-DLCL2 B fue de 18 y 39 ng/ml, respectivamente.

La actividad de muerte de células B del anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/40G5c K&H) se ensayó en diversas estirpes celulares, como se describe en la Figura 7A–B. La estirpe celular HT es una célula que no expresa CD79b. El porcentaje de muerte de células B se calculó de la siguiente manera: $(\text{número de células B vivas sin TDB} - \text{número de células B vivas con TDB}) / (\text{número de células B vivas sin TDB}) * 100$. Se expone en la Figura 7A una curva de dosis y respuesta de muerte de células B para células BJAB, WSU-DLCL2 y OCI-LY-19, con valores EC_{50} de muerte de células B de 8.87, 2.63 y 17.41 ng/ml para OCI-Ly-19, BJAB, y WSU-DLCL2, respectivamente. La Figura 7B muestra

significativa muerte de células B con 5000 ng/ml de anticuerpo TDB anti-CD79/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1 K&H) a través de múltiples estirpes celulares (duplicado, promedio $\pm$ STD (desviación típica, conforme a sus siglas en inglés)).

Las diversas eficacias de los anticuerpos TDB generados con biespecificidad para CD3 y CD79b se encuentran con puntajes inferiores a las contribuciones críticas e impredecibles de ambas ramas de anticuerpo en la generación de un TDB ejemplar que posea alta eficacia. y

4. Eficacia *in vitro* e *in vivo* en células B resistentes a anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE.

La actividad de muerte de células B de anticuerpos TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) *in vitro* e *in vivo* se ensayó además en células B resistentes a anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE. Las variantes de células BJAB (BJAB-CD79b ADC-R T1.1 y BJAB-SN8v28vcE CD79b ADC-R T1.2) se derivaron de tumores de xenoinjertos BJAB no sensibles en ratones tratados con células B resistentes a anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE. Como se muestra en la Figura 8A, el TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) fue muy eficaz en BJAB, al igual que en la muerte celular de células BJAB resistentes a anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE *in vitro*. Adicionalmente, como se muestra en la Figura 8B, el anticuerpo TDB anti-CD79b/CD3 (CD79b.A7.v14b/38E4v1) evita el crecimiento tumoral BJAB resistente a anti-CD79b-MC-vc-PAB-MMAE *in vivo*.

Si bien la invención precedente se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención. Las revelaciones de toda la literatura de patentes y científica citadas en la presente solicitud se incorporan de manera expresa en su totalidad, a modo de referencia.

DENOMINACIÓN	SECUENCIA	SEQ ID NO
CD79b humano precursor; Acc. No. NP_000617.1; secuencia de señal = aminoácidos 1 a 28	RFIARKRGFT VKMH CYMNSA SGNVSWLWKQ EMDENPQQLK LEKGRMEESQ NESLATLTIQ GIRFEDNGIY FCQQKCNNTS EVYQGCGETEL RVMGFSTLAQ LKQRNTLKDG IIMIQTLII LFIIVPIFLL LDKDDSKAGM EEDHTYEGLD IDQTATYEDI VTLRTGEVKW SVGEHPGQE	1
CD79b maduro humano, sin secuencia de señal; aminoácidos 29 a 229	AR SEDRYRNPKG SACSRIWQSP RFIARKRGFT VKMH CYMNSA SGNVSWLWKQ EMDENPQQLK LEKGRMEESQ NESLATLTIQ GIRFEDNGIY FCQQKCNNTS EVYQGCGETEL RVMGFSTLAQ LKQRNTLKDG IIMIQTLII LFIIVPIFLL LDKDDSKAGM EEDHTYEGLD IDQTATYEDI VTLRTGEVKW SVGEHPGQE	2
CD79b.A7, CD79b.A7.v14 CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR-H1	TYWMN	3
CD79b.A7.v14b HVR-H1	TYYMN	4
HVR-H1 consenso	TYX ₁ MN, donde X ₁ es W o Y	5
CD79b.A7, CD79b.A7.v14 CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR-H2	MIDPSDSETHYNQMFKD	6
CD79b.A7.v14b HVR-H2	MIDPSDSETHYNQKFQG	7
HVR-H2 consenso	MIDPSDSETHYNQX ₂ FX ₃ X ₄ , donde X ₂ es M o K, X ₃ es K o Q, y X ₄ es D o G.	8
CD79b.A7, CD79b.A7.v14 CD79b.A7.v14b CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR-H3	SLAF	9
CD79b.A7, CD79b.A7.v14	KSSQSLLDSDGKTYLN	10

CD79b.A7.v14b CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR–L1		
CD79b.A7, CD79b.A7.v14 CD79b.A7.v14b CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR–L2	LVSKLDS	11
CD79b.A7, CD79b.A7.v14 CD79b.A7.v14b CD79b.A7.v15 CD79b.A7.v18 CD79b.A7.v19 CD79b.A7.v20 CD79b.A7.v21 HVR–L3	WQGTHFPQT	12
K2H1 Región variable de cadena pesada (V _H)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYIHWVRQAP GQGLEWIGWINPGSGNTNYAQKFQGRVTITRDTSTSTAYLEL SSLRSEDVAVYYCARFDYWGQGTLVTVSS	13
K2H1 Región variable de cadena liviana (V _L)	DIVMTQTPLSLPVTPGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCQQAIFPFTFGQGTKVEIK	14
CD79b.A7 V _H	QVQLQQPGVELVRPGASVKLSCKASGYTFTTYWMNWVRQR PGQGLDWIGMIDPSDSETHYNQMFKDKATLTVDKSSSTAYIQ LNSLTSEDSAVYYCSRSLAFWGQGTLVTVSA	15
CD79b.A7 V _L	DVVMQTPTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ RPGQSPKCLIIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKLEIK	16
CD79b.A7.v14 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRATLTVDSTSTAYLE LSSLRSEDVAVYYCSRSLAFWGQGTLVTVSS	17
CD79b.A7.v14 V _L	DIVMTQTPLSLPVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ KPGQSPQSLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	18
CD79b.A7.v14b V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMNWVRQAP GQGLEWIGMIDPSDSETHYNQKFQGRATLTVDSTSTAYLEL SSLRSEDVAVYYCSRSLAFWGQGTLVTVSS	19
CD79b.A7.v14b V _L	DIVMTQTPLSLPVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ KPGQSPQSLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	20
CD79b.A7.v15	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMNWVRQA	21

V _H	PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRATLTVDTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCSRSLAFWGQGT LVT VSS	
CD79b.A7.v15 V _L	DVVM TQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL QKPGQSPQSLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGTHFPQTFGQGTKVEIK	22
CD79b.A7.v18 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTTYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRATLTVDKSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCSRSLAFWGQGT LVT VSS	23
CD79b.A7.v18 V _L	DIVMTQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ KPGQSPQSLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCWQGTHFPQTFGQGTKVEIK	24
CD79b.A7.v19 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTTYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRATLTVDKSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCSRSLAFWGQGT LVT VSS	25
CD79b.A7.v19 V _L	DVVM TQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL QKPGQSPQSLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGTHFPQTFGQGTKVEIK	26
CD79b.A7.v20 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTTYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRATITVDTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCSRSLAFWGQGT LVT VSS	27
CD79b.A7.v20 V _L	DIVMTQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ KPGQSPQSLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCWQGTHFPQTFGQGTKVEIK	28
CD79b.A7.v21 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTTYWMNWVRQA PGQGLEWIGMIDPSDSETHYNQMFKDRVTLTVDTSTSTAYLE LSSLRSED TAVYYCSRSLAFWGQGT LVT VSS	29
CD79b.A7.v21 V _L	DIVMTQTPLSLPVT PGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ KPGQSPQSLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCWQGTHFPQTFGQGTKVEIK	30
SN8.new HVR– H1	SYWIE	31
SN8.new HVR– H2	EILPGGGDTNYNEIFKG	32
SN8.new HVR– H3	RVPIRLDY	33
SN8.new HVR– L1	KASQSV DYGDSFLN	34
SN8.new HVR– L2	AARKLGR	35
SN8.new HVR– L3	QQSNEDPLT	36
SN8.new V _H	EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAP GKGLEWVGEILPGGGDTNYNEIFKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGT LVT VSS	37
SN8.new V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV DYGDSFLN WYQ QKPGKAPKLLIYAARKLGRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK	38
40G5c HVR–H1	NYIIH	39
40G5c HVR–H2	WIYPGDGNTKYNEKFKG	40
40G5c HVR–H3	DSYSNYYFDY	41
40G5c HVR–L1	KSSQSLLNSRTRKNYLA	42
40G5c HVR–L2	WASTRES	43

40G5c HVR–L3	TQSFILRT	44
38E4v1 HVR–H1	SYIIH	45
38E4v1 HVR–H2	WIYPENDNTKYNEKFKD	46
38E4v1 HVR–H3	DGYSRYYFDY	47
38E4v1 HVR–L1	KSSQSLLNSRTRKNYLA	48
38E4v1 HVR–L2	WTSTRKS	49
38E4v1 HVR–L3	KQSFILRT	50
UCHT1v9 HVR–H1	GYTMN	51
UCHT1v9 HVR–H2	LINPYKGVSTYNQKFKD	52
UCHT1v9 HVR–H3	SGYYGDSWDYFDV	53
UCHT1v9 HVR–L1	RASQDIRNYLN	54
UCHT1v9 HVR–L2	YTSRLES	55
UCHT1v9 HVR–L3	QQGNTLPWT	56
40G5c V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYIHWVRQAP GQGLEWIGWIYPGDGNTKYNEKFKGRATLTADTSTSTAYLEL SSLRSEDVAVYYCARDYSNYYFDYWGQGTLVTVSS	57
40G5c V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCTQSFILRTFGQGTKVEIK	58
38E4v1 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTSYIIHWVRQAP GQGLEWIGWIYPENDNTKYNEKFKDRVTITADTSTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCARDGYSRYYFDYWGQGTLVTVSS	59
38E4v1 V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWTSTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCTQSFILRTFGQGTKVEIK	60
UCHT1v9 V _H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA PGKDLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQ MNSLRAEDVAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGTLVTVSS	61
UCHT1v9 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAT YYCQQGNTLPWTFGQGTKLELK	62
Péptido 1	ARSEDYRNPKGSACSRIWQS	63
Péptido 2	AKSEDLYPNPKGSACSRIWQS	64