SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-147461- -00000-0000
Fecha: 2011-10-31 17:45:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 679

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"ANTICUERPOS ANTI-FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO".**

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

71. SOLICITANTE **GENENTECH, INC**

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

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

22. BOGOTÁ, D.C. 31 OCT 2011

(FORMA P 10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-147461- -00000-0000
Fecha: 2011-10-31 17:45:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 679

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: South San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
④ INVENTOR(ES) (72)	Nombre: ELKINS, Kristi; POLSON, Andrew; EBENS, Allen; ADAMS, Camelia; ZHENG, Bing; JUNUTULA, Jagath, R.; HONGO, Jo-anne y WU, Yan. Dirección: 524 Maple Avenue, South San Francisco, CA 94080; 281 Berkeley Way, San Francisco, CA 94131; 1932 Arroyo Avenue, San Carlos, CA 94070; 1899 Lakebird Drive, San Jose, CA 95124; 156 Montelena Ct., Mountain View, CA 94040; 34391 Tupelo Street, Fremont, CA 94555; 31 Shaw Court, Redwood City, CA 94061 y 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/029516 Fecha: 31/03/10

Publicación Internacional No. WO 2010/120561 A1 Fecha: 21/10/10

⑥ Título (54) "ANTICUERPOS ANTI–FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO"

⑦ Clasificación Internacional (51) C07K 16/28

⑧ Prioridad

SI ☒ NO ☐

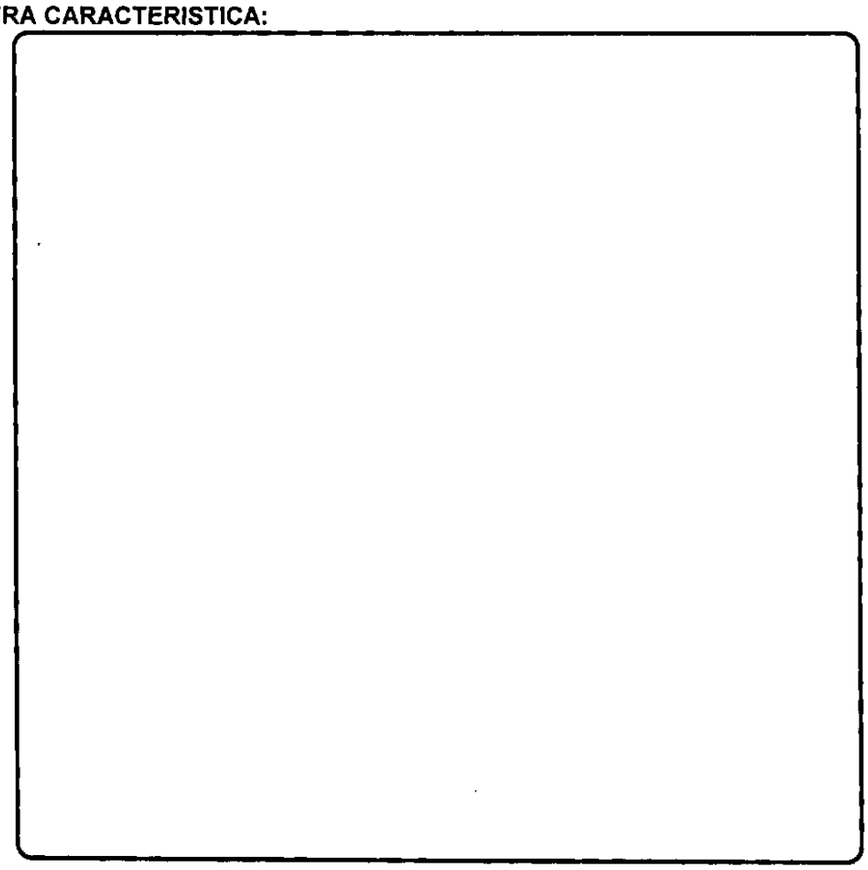
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	01/04/09	61/211,695
US	02/04/09	61/166,217
US	04/12/09	61/266,972

⑨ Comprobante de Pago No. 11-0089475 **Fecha:** 13-09-2011

(10) **ANEXOS**

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

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA: _____

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0089475

Bogotá D.C., Septiembre 13 de 2011 - 07:40:03

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA S.A. NI 8.300.221.455

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999620	12/09/2011	20.066.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-147461- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 17:45:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 679

2

ANEXO

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

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Traducción Oficial Nº 10-31-191

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

APOSTILLA
(Convención de la Haya Octubre 1961)

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

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

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174484

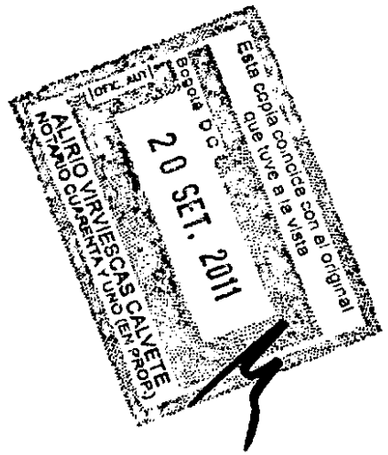
Ilegi Esp

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

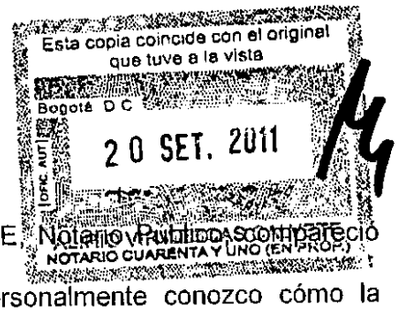
NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN



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

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

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

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

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

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

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

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

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

Firma (ilegible)

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

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

Traducción Oficial Nº 10-31-192

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

APOSTILLA
(Convención de la Haya Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

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

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

6

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174485

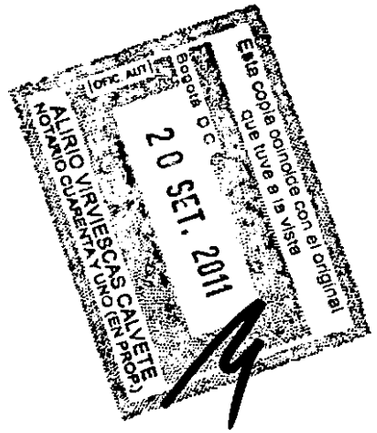
Elba Espejo

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D C
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

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

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

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

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

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

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

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

Traducción Oficial Nº 10-31-193

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

APOSTILLA
(Convención de la Haya Octubre 1961)

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174487

Ilbar Espand

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO DE GENENTECH, INC.

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

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

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

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

ARTÍCULO 3

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

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

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

ARTICULO 4

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

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

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

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

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

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

SECCION 4.03. *Acciones Preferenciales*

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.N. PROP.)

LEBARA ESPAÑOL INGLÉS
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

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

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

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

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

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

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETTE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

13

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

ARTÍCULO 5

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

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (S.P.)

14

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

ARTÍCULO 6

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE

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

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

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
20 SET. 2011

ARTÍCULO 7

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

ARTÍCULO 8

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALVARO VIRVIESCAS CALLEJAS
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.S.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés

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

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

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérpetre Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

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

ARTÍCULO 9

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés-Español

Esta copia concuerda con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés

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

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

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

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALVARO VARGAS GALVIS
NOTARIO CUARENTA Y UNO

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

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

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

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
20 SET. 2011
AURIO VARGAS CALVETTI

Traducción Oficial Nº 10-31-194

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

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174088

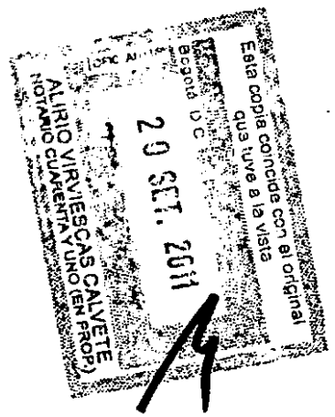
Elba Espinel

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

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

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

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

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

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

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

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

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

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

Esta copia es fiel y concuerda con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

28

Traducción Oficial Nº 10-31-195

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

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

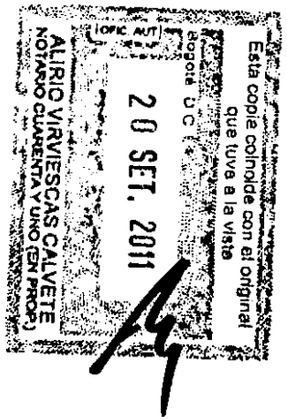
2005 OCT 31 A 10:59

17488

Ilbar Espand

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

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

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

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

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



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

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

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

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

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

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D C
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

Traducción Oficial Nº 10-31-196

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

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

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

CERTIFICADO

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

Secretario de Estado

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174490

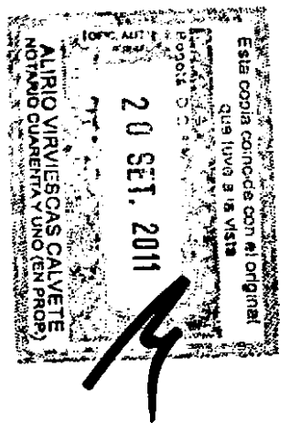
Ilbar Espanol

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

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

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

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

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO EN PROP.

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

10. *Signature*

Secretary of State

NP-24 A (REV. 4-05)

BY

OSP 05 90772

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

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

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

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

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

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

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Bueu

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

Signer(s) Other Than Named Above: None

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

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

Signer Is Representing: _____

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

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

Los abajo firmados,

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

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Dado y firmado a los 13 días de Sep. 2005

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

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under laws od State of Delaware, E.U.A
domiciled at

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

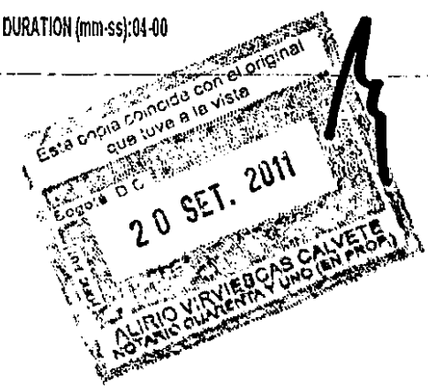
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property,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

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

Given and signed this 13 Sept 2005

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See attached.



(2

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

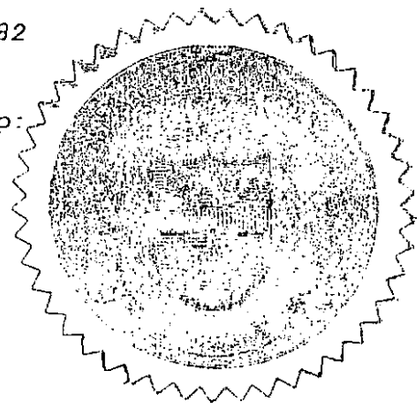
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265282

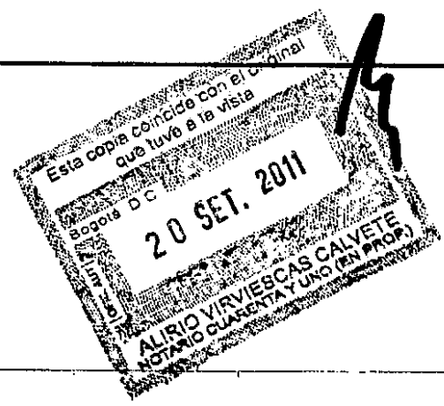
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

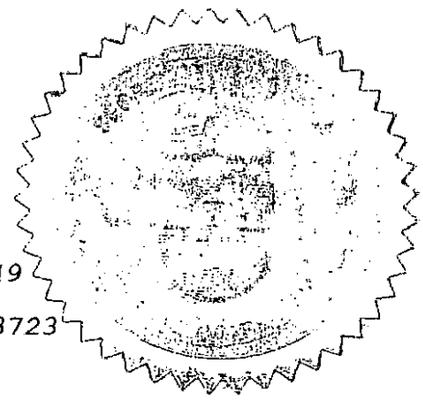
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER,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

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

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

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





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

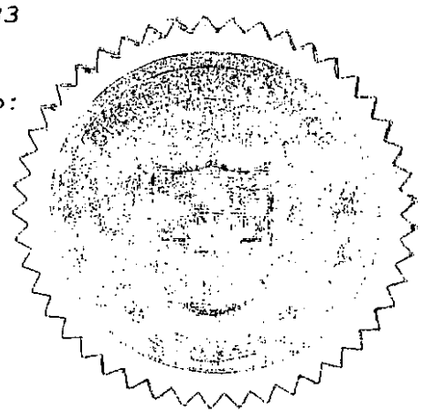
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265283

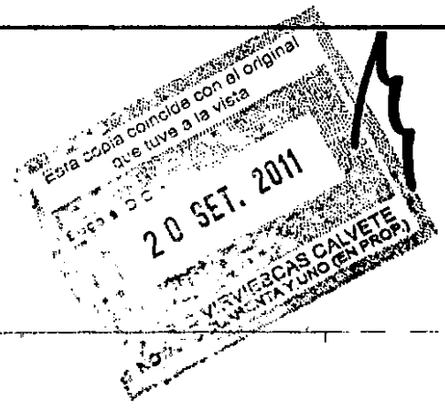
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

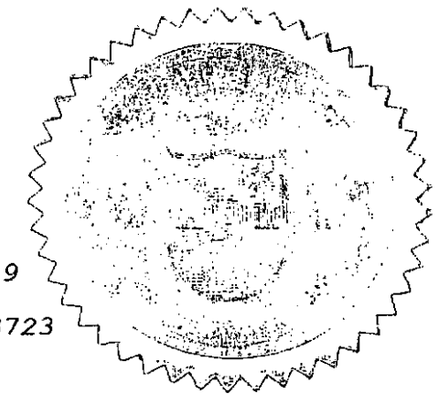


Delaware

The First State

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





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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



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

ARTICLE 4

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

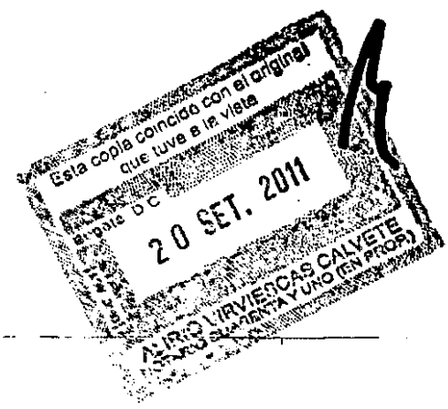
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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

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

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

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

ARTICLE 5

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

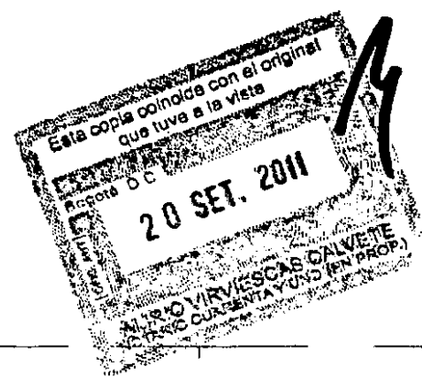
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

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

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

ARTICLE 6

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



47

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

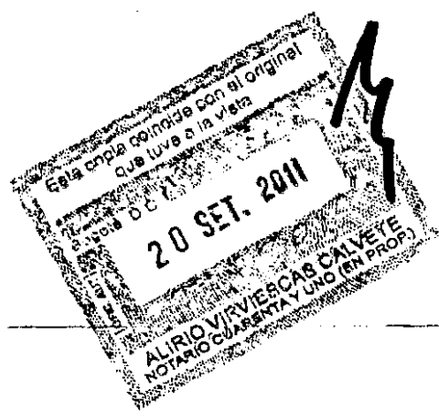
SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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

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

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

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



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

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

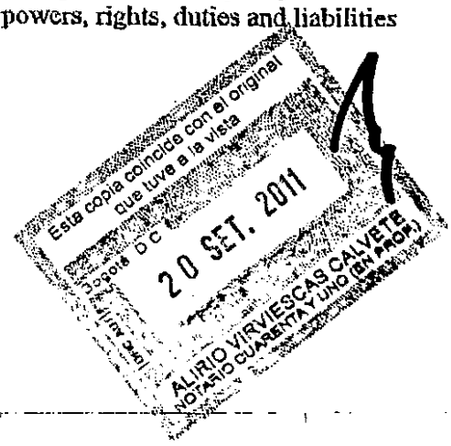
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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



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

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

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

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

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

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

Este copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

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

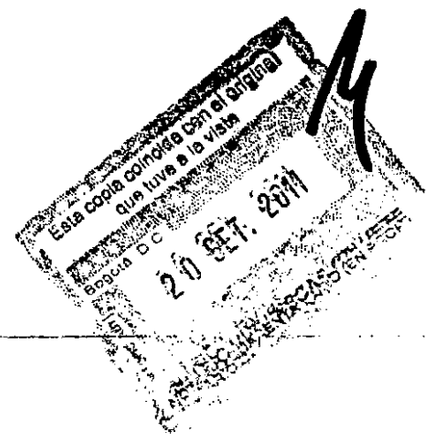
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent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

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

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

ARTICLE 9

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



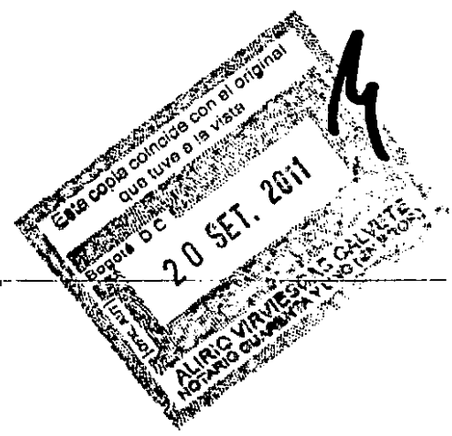
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment,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

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

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

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

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



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

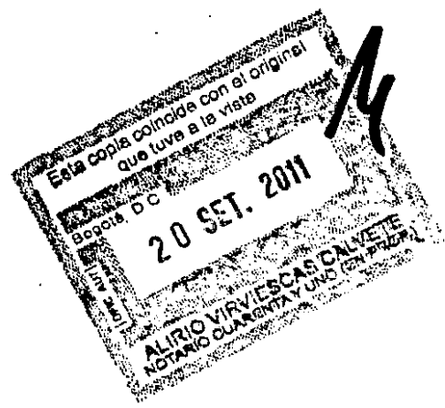
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



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

GENENTECH, INC.

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



(4)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

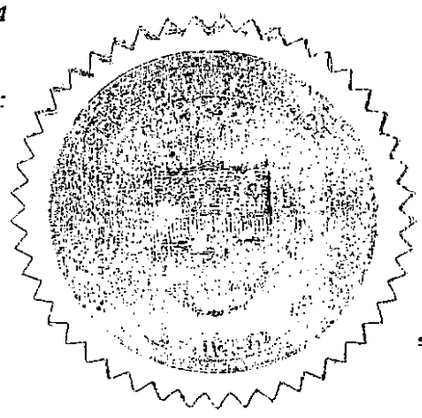
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265284

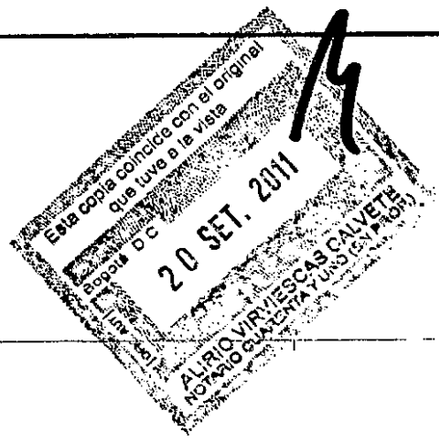
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

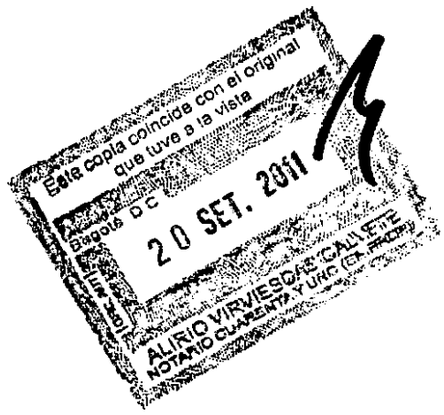


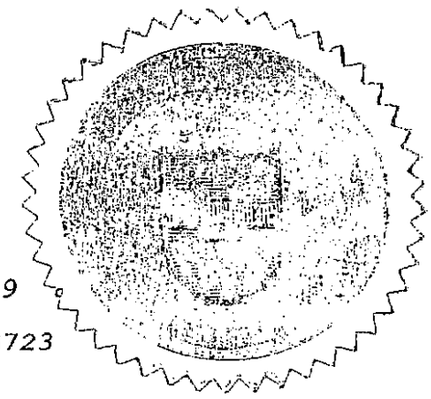
194

Delaware

The First State

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





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

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

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

75841

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALARIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.P.)

57

(5)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

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

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

Certified

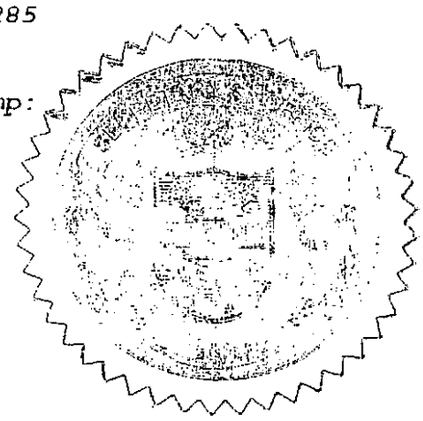
5. *at Dover, Delaware*

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

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265285*

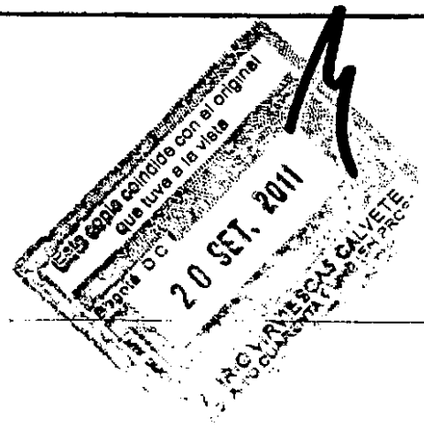
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

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



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 - 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/09/00/AM/05/10/2001/ D
P ///010226224/F/2112549////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

86747

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista.
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

60

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

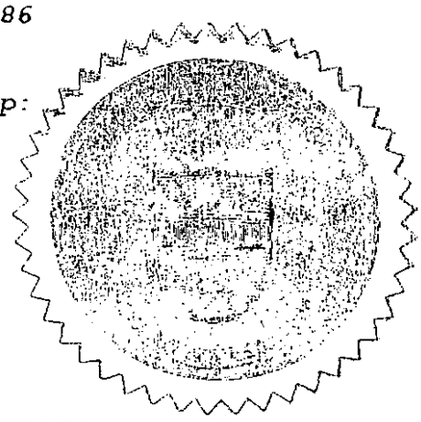
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

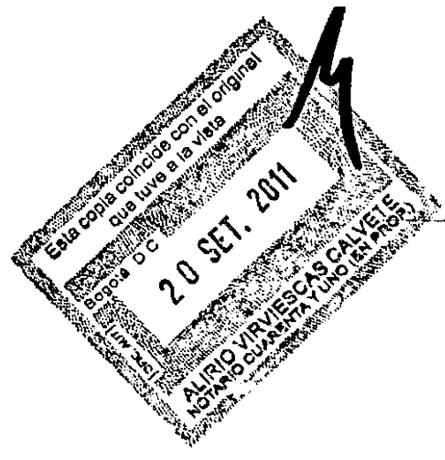
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

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



2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#153087

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
20 SET. 2011
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO EN PROP.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 31-10-11

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
61/211,695	01-04-09	US
61/166,217	02-04-09	US
61/266,972	04-12-09	US

(51) Int Cl: C07K 16/28

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

(72) Inventor(es): ELKINS, Kristi; POLSON, Andrew; EBENS, Allen; ADAMS, Camelia; ZHENG, Bing; JUNUTULA, Jagath, R.; HONGO, Jo-anne y WU, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-11-11
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 31-03-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/029516***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***21-10-10***
No. publicación: ***WO 2010/120561 A1***

(54) Titulo: **"ANTICUERPOS ANTI-FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO".**

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en los mamíferos y a los métodos que usan estas composiciones para lo mismo.

Sector: Inmunoglobulinas, por ejemplo anticuerpos monoclonales o policlonales, contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de superficie celular; preparaciones medicinales que contienen dichas inmunoglobulinas; agentes antineoplásicos específicos para leucemia; células humanas, animales o de plantas modificadas mediante la introducción de material genético extraño; péptidos híbridos.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS
PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) No. de solicitud:
(22) Fecha de solicitud: 31-10-11
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28

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

(72) Inventor(es): ELKINS, Kristi; POLSON, Andrew; EBENS, Allen; ADAMS, Camelia; ZHENG, Bing; JUNUTULA, Jagath, R.; HONGO, Jo-anne y WU, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31)	***No. Prioridad***	(32)	***Fecha***	(33)	***País***
		61/211,695		01-04-09		US
		61/166,217		02-04-09		US
		61/266,972		04-12-09		US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 01-11-11
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 31-03-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/029516***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***21-10-10***
No. publicación: ***WO 2010/120561 A1***

(54) Titulo: **ANTICUERPOS ANTI-FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO.**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

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

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-10-11
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28

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

(72) Inventor(es): ELKINS, Kristi; POLSON, Andrew; EBENS, Allen; ADAMS, Camelia; ZHENG, Bing; JUNUTULA, Jagath, R.; HONGO, Jo-anne y WU, Yan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) *No. Prioridad*	(32) *Fecha*	(33) *País*
	61/211,695	01-04-09	US
	61/166,217	02-04-09	US
	61/266,972	04-12-09	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-11-11
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 31-03-10
No. de solicitud: ***PCT/US2010/029516***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***21-10-10***
No. Publicación : ***WO 2010/120561 A1***

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo: **ANTICUERPOS ANTI-FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO.**

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-
La presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en los mamíferos y a los métodos que usan estas composiciones para lo mismo.

Sector: Inmunoglobulinas, por ejemplo anticuerpos monoclonales o policlonales, contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de superficie celular; preparaciones medicinales que contienen dichas inmunoglobulinas; agentes antineoplásicos específicos para leucemia; células humanas, animales o de plantas modificadas mediante la introducción de material genético extraño; péptidos híbridos.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
GNE-0350 PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2010/029516	31/03/2010	01/04/2009
Applicant		
GENENTECH, INC.		

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

This international search report consists of a total of 7 sheets.

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

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

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

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

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

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

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

Form PCT/ISA/210 (first sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/029516

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

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

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

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

3. Additional comments:

EG

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

The present invention is directed to antibodies specific for FcRH5, to compositions comprising said antibodies useful for the treatment of hematopoietic tumors in mammal and to methods of using said compositions for said purpose.

INT NATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/029516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/02 C12N15/13 C12N5/20
C07K19/00 G01N33/574
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K G01N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/039238 A2 (EPRESENTED BY THE SECRETARY OF [US]; PASTAN IRA H [US]; ISE TOMOKO [US] 13 April 2006 (2006-04-13)	1-4,7, 10-48, 50-62, 67-96, 162-165, 169-192
Y	page 6, lines 20-25 page 32, lines 19-31 page 33, lines 25-29 page 34, lines 1-12 page 35, line 6 - page 37, line 7 page 39, line 18 - page 42, line 37 page 53, line 28 - page 54, line 23 page 63, line 30 - page 66, line 21 page 64; table 3 * abstract	63-66, 97-161, 166-168

-/--

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 August 2010	23/08/2010

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

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

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISE TOMOKO ET AL: "Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2 protein on lymphoma cell lines and hairy cell leukemia cells detected by novel monoclonal antibodies" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 87-96, XP002528392 ISSN: 1078-0432 page 91; table 1	24-29, 32-34, 52-56, 169-171
X	ISE T ET AL: "Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma" LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US LNKD-DOI:10.1038/SJ.LEU.2404445, vol. 21, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 169-174, XP002587809 ISSN: 0887-6924 [retrieved on 2006-10-19] * abstract page 170, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2	24-29, 32-34, 52-56, 169-171
X	WO 2006/076691 A2 (MEDAREX INC [US]; GRAZINO ROBERT [US]; KING DAVID J [US]; SRINIVASAN M) 20 July 2006 (2006-07-20)	1-6,8,9, 11-62, 67-96, 162-165, 169-199
Y	page 15, paragraph 1 page 59 - page 64; examples 1-3 page 7, paragraph 3 sequences 13-16 page 17, paragraph 3 - page 19, paragraph 1 page 41, paragraph 3 - page 43, paragraph 1	63-66, 97-161, 166-168
X	WO 2008/109533 A2 (MEDAREX INC [US]; GRAZIANO ROBERT [US]; HUANG HAICHUN [US]; YANG LAN [) 12 September 2008 (2008-09-12)	1-4,6,9, 11-20, 23-48, 50-62, 67-96, 162-165, 169-192
Y	page 17, lines 24-28 pages 74-82; examples 1-4 page 53, line 23 - page 55, line 25 page 67, line 30 - page 68, line 7	63-66, 97-161, 166-168

-/--

2

International application No
PCT/US2010/029516

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/38490 A2 (UNIV COLUMBIA [US]) 31 May 2001 (2001-05-31) the whole document	1-199
A	POLSON ANDREW G ET AL: "Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB LNKD-DOI:10.1093/INTIMM/DXL069, vol. 18, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1363-1373, XP002487226 ISSN: 0953-8178 [retrieved on 2006-07-18] the whole document	1-199
Y	WO 2005/117986 A2 (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15) the whole document	63-66
Y	WO 2006/034488 A2 (GENENTECH INC [US]; EIGENBROT CHARLES W [US]; JUNUTULA JAGATH REDDY [U) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document	97-161, 166-168
X	WO 2005/063299 A2 (GENENTECH INC [US]; CHANG WESLEY [US]; DE SAUVAGE FREDERIC [US]; EATON) 14 July 2005 (2005-07-14) page 137, line 21 page 145, line 11	165

2

70

INT' 'NATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2010/029516

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006039238 A2	13-04-2006	US 2008292632 A1	27-11-2008
WO 2006076691 A2	20-07-2006	AU 2006204709 A1	20-07-2006
		CA 2594318 A1	20-07-2006
		CN 101103042 A	09-01-2008
		EP 1846449 A2	24-10-2007
		JP 2008526260 T	24-07-2008
		KR 20070115881 A	06-12-2007
		US 2008247944 A1	09-10-2008
WO 2008109533 A2	12-09-2008	NONE	
WO 0138490 A2	31-05-2001	AU 2048901 A	04-06-2001
		CA 2393126 A1	31-05-2001
		EP 1235847 A2	04-09-2002
		JP 2003532378 T	05-11-2003
WO 2005117986 A2	15-12-2005	AU 2005249490 A1	15-12-2005
		BR PI0510883 A	26-12-2007
		CA 2567520 A1	15-12-2005
		EP 1753463 A2	21-02-2007
		JP 2008501029 T	17-01-2008
		KR 20070037575 A	05-04-2007
		NZ 551180 A	30-10-2009
WO 2006034488 A2	30-03-2006	AU 2005286607 A1	30-03-2006
		BR PI0516284 A	02-09-2008
		CA 2580141 A1	30-03-2006
		CN 101065151 A	31-10-2007
		EP 1791565 A2	06-06-2007
		JP 2008516896 T	22-05-2008
		KR 20070054682 A	29-05-2007
		NZ 553500 A	27-11-2009
WO 2005063299 A2	14-07-2005	AU 2004308972 A1	14-07-2005
		AU 2009202783 A1	30-07-2009
		CA 2551813 A1	14-07-2005
		US 2008166294 A1	10-07-2008

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 October 2010 (21.10.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/120561 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/20* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/029516

(22) International Filing Date:
31 March 2010 (31.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/211,695	1 April 2009 (01.04.2009)	US
61/166,217	2 April 2009 (02.04.2009)	US
61/266,972	4 December 2009 (04.12.2009)	US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ELKINS, Kristi** [US/US]; 524 Maple Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **POLSON, Andrew** [US/US]; 281 Berkeley Way, San Francisco, CA 94131 (US). **EBENS, Allen** [US/US]; 1932 Arroyo Avenue, San Carlos, CA 94070 (US). **ADAMS, Camelia** [US/US]; 1899 Lakebird Drive, San Jose, CA 95124 (US). **ZHENG, Bing** [CN/US]; 156 Montelena Ct., Mountain View, CA 94040 (US). **JUNUTULA, Jagath, R.** [IN/US]; 34391 Tupelo Street, Fremont, CA 94555 (US). **HONGO, Jo-anne** [US/US]; 31 Shaw Court, Redwood City, CA 94061 (US). **WU, Yan** [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (US).

(74) Agents: **FARIS, Alissa, H.** et al.; Arnold & Porter, LLP, 1400 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94303-1124 (US).

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

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

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2010/120561 A1

(54) Title: ANTI-FCRH5 ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention is directed to antibodies specific for FcRH5, to compositions comprising said antibodies useful for the treatment of hematopoietic tumors in mammal and to methods of using said compositions for said purpose.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

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

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2010/029516	31.03.2010	01.04.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/02 C12N15/13 C12N5/20 C07K19/00 G01N33/574

Applicant
GENENTECH, INC.

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

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

2. **FURTHER ACTION**

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Irion, Andrea Telephone No. +49 89 2399-8174

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (July 2009)

Box No. I Basis of the opinion

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

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

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

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

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

   a. (means)

      ☐ on paper

      ☒ in electronic form

   b. (time)

      ☒ in the international application as filed

      ☐ together with the international application in electronic form

      ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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

5. Additional comments:

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-4, 11-16, 19, 20, 23-48, 52-164, 166-199
	No: Claims	5-10, 17, 18, 21, 22, 49-51, 165
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-199
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-199
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Item V

V.1 Reference is made to following documents

D1 WO 2006/039238 A2 (REPRESENTED BY THE SECRETARY OF [US]; PASTAN IRA H [US]; ISE TOMOKO [US) 13 April 2006 (2006-04-13)

D2 ISE TOMOKO ET AL: "Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2 protein on lymphoma cell lines and hairy cell leukemia cells detected by novel monoclonal antibodies"CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01) , pages 87-96, XP002528392ISSN: 1078-0432

D3 ISE T ET AL: "Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma"LEUKEMIA (BASINGSTOKE), vol. 21, no. 1, January 2007 (2007-01) , pages 169-174, ISSN: 0887-6924

D4 WO 2006/076691 A2 (MEDAREX INC [US]; GRAZINO ROBERT [US]; KING DAVID J [US]; SRINIVASAN M) 20 July 2006 (2006-07-20)

D5 WO 2008/109533 A2 (MEDAREX INC [US]; GRAZIANO ROBERT [US]; HUANG HAICHUN [US]; YANG LAN [) 12 September 2008 (2008-09-12)

D6 WO 01/38490 A2 (UNIV COLUMBIA [US]) 31 May 2001 (2001-05-31)

D7 POLSON ANDREW G ET AL: "Expression pattern of the human FcRH/ IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia"INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB LNKD- DOI:10.1093/INTIMM/DXL069, vol. 18, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01) , pages 1363-1373, XP002487226ISSN: 0953-8178 [retrieved on 2006-07-18]

D8 WO 2005/117986 A2 (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15)

D9 WO 2006/034488 A2 (GENENTECH INC [US]; EIGENBROT CHARLES W [US]; JUNUTULA JAGATH REDDY [U) 30 March 2006 (2006-03-30)

D10 WO 2005/063299 A2 (GENENTECH INC [US]; CHANG WESLEY [US]; DE SAUVAGE FREDERIC [US]; EATON) 14 July 2005 (2005-07-14)

V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)

V.2.1 Prior art documents

Document D1 describes the anti-IRTA2 (=FcRH5) antibodies F119, F56 and F25 which are defined by their VH/VL sequences (SEQ ID NO. 1-6) (p. 6 l. 20-25, p. 32 l. 22-31). Said antibodies bind IRTA2 with an affinity constant of at least 10^9 M^{-1} (p. 32 l. 19-21). F25 binds to epitope 2, which is located at amino acids 1 to 109 of SEQ ID NO. 13 (p. 33 l. 25-29). F119 binds to epitope 3 which is located at amino acids 191 to 286 of SEQ ID NO. 13 (p. 34 l. 1-4). F56 binds to epitope 11 which is located at amino acids287 to 565 of SEQ ID NO. 13 (p. 34 l. 6-12). Chimeric and humanized antibodies are described (p. 35 l. 6 - p. 37 l. 7). Effector molecules such as therapeutics, diagnostic or detection moieties may be linked to the anti-IRTA2 antibody, e.g. toxins (p. 39 l. 18 - p. 42 l. 37). Methods for detecting IRTA2 using said antibodies are described (p.53 l. 28 - p. 54 l. 23). The production and characterization of said antibodies is described in Examples 3-5 on p. 63 l. 30 - p. 66 l. 21. All the monoclonal antibodies reacted to IRTA2 with high affinity (KD 1.1 to 18.7 nM, 5.4 nM in average), i.e. F25 1.2 nM, F56 4.4 nM and F119 5.4 nM (Table 3 on p. 64). Said antibodies may be used for the treatment of B cell malignancies such as hairy cell leukemia and NHL (abstract).

Document D2 appears to be the scientific publication of D1 describing the anti-IRTA2 antibodies F119, F56 and F25 having a binding affinity 5.4, 4.4, 1.2 nM (p. 91 Table 1).

Document D3 describes the elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant B-cells (MM, CLL and MCL) (abstract). CF307 protein is detected by using anti-CD307 antibodies F1, F25 and F56 (p. 170 left-hand col. 2nd paragraph and right-hand col. 2nd paragraph).

Document D4 describes the human anti-IRTA2 antibodies 9D12 and 8A1 having high affinity binding to human IRTA2, i.e. KD 2.1 x 10^{-9} and 20.0 x 10^{-9}, respectively (p. 15 1st paragraph, Examples 1-3 on p. 59-64). Said antibodies are defined by the sequences of their VH and VL (p. 2 6th paragraph, SEQ ID NO. 13-16). Said antibodies may be used for the treatment of B cell malignancies such as NHL, CLL, follicular lymphomas, DLCL and MM (p. 7 3rd paragraph). Human antibodies binding to IRTA2 are described (p. 17 3rd paragraph - p. 19 1st paragraph). Immunoconjugates are described (p. 41 3rd paragraph - p. 43 1st paragraph).

Document D5 describes the human anti-IRTA2 antibody 1B10 having a KD of 2.07 x 10^{-9} M (p. 17 l. 24-28, Examples 1-4 on p. 74-82). Immunoconjugates are described (p. 53 l. 23 - p. 55 l. 25). Said antibody may be used for the diagnosis and treatment of T and B cell malignancies (p. 67 l. 30 - p. 68 l. 7).

Document D6 describes IRTA2-expression pattern and suggests the production of anti-IRTA2 antibodies being useful for the diagnosis and treatment of Lymphoma and melanoma (abstract, p. 8 l. 9-25, p. 40 l. 27 - p. 46 l. 6).

D7 and D8 describe expression pattern of FcRH5/IRTA2 using the mouse anti-FcRH5/IRTA2 antibody 7D11, which is neither defined by its sequences nor deposited under the Budapest Treaty. Document D8 describes further SMCC-DM1 immunoconjugates.

Document D9 describes cysteine engineered antibodies and their use in treatment and diagnosis, wherein antibodies against IRTA2 are mentioned in a long list of possible antibodies.

Document D10 describes anti-FcRH5 antibodies, e.g. an antibody designated 7D11 deposited under the Accession number PTA-6340 (p. 137 l. 21, and p. 145 l. 11).

V.2.2 With respect to claims 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17 and 18

The application as filed shows that the antibody designated hu10A8v1 comprising the sequences referred to as SEQ ID NO. 19 and 21 has an affinity (Scatchard analysis) to human antigen expressed on OPM2 cells of 1.44 nM (Table 10 on p. 187). The affinity of the murine antibody 10A8 measured by Biocore is not shown (Table 9 on p. 181). Since the binding affinity is dependent on the determination method the antibody 8A1 having high affinity binding to human IRTA2, i.e. KD 20.0 x 10^{-9} described in D4 is novelty destroying for the subject-matter of claims 5 and 8 (Article 33(2) PCT). Furthermore, the human antibody 9D12 described in D4 (KD 2.1 nM) and the human antibody 1B10 described in D5 (KD 2.07 nM) are novelty destroying for the subject-matter of claims 6 and 9 (Article 33(2) PCT).

Document D1 describes humanized antibodies binding to IRTA2 with an affinity constant of at least 10^{7} M, 10^{8} M or 10^{9}M (p. 35 l. 13-15). Said humanized antibodies are based on the CDRs derived from F25, F56 and F119 (p. 35 l. 8-13). Therefore, the subject-matter of claims 7 and 10 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

The subject-matter of claims 17 and 18 is not considered novel in the light of D4, D5 or D1.

V.2.3 With respect to claims 21 and 22

In the light of D1 and D4, the subject-matter of claims 21 and 22 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.2.4 With respect to claim 49

Each of the cited prior art documents D1-D5 describe a method of making an anti-FcRH5 antibody as defined in claim 49, since monoclonal antibodies are produced by eukaryotic host cells Furthermore, D4 describes the expression of antibodies in CHO cells (p. 39 3rd paragraph). Therefore, the subject-matter of claim 49 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.2.5 With respect to claims 50 and 51

The subject-matter of claims 50 and 51 refers to an antibody which binds the same epitope as an antibody variant of an antibody comprising the sequence referred to as SEQ ID NO. 21 (claim 50) and comprising the sequence referred to as SEQ ID NO. 21 and 19 (claim 51) (or a variant of said sequences). The epitope is not defined by a specific amino acid sequence. Since the antibody variant is not defined by any structural feature, e.g. by the HVRs, each and every antibody falls under this expression. Therefore, the subject-matter of claims 50 and 51 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.2.6 With respect to claim 165

In the light of D10, the subject-matter of claim 165 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.2.7 With respect to claims 1-4, 11-16, 19, 20, 23-48, 52-164, 166-199

The subject-matter of claims 1-4, 11-16, 19, 20, 23-48, 52-164, 166-199 does not appear to be described in the documents cited above. Therefore, the subject-matter of claims 1-4, 11-16, 19, 20, 23-48, 52-164, 166-199 appears to be novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

V.3.1 With respect to claims 1-4, 23, 46-48, 57-59, 67-96, 162, 163 and 172-192

The antibody claimed in claims 1-4 are defined by comprising at least one of the sequences referred to as SEQ ID NO. 26-28 and 35-37 and at least one variant HVR. Said variant comprises modifications (substitution, insertion or deletion) of at least one residue. Therefore, the sequence of said variant is undefined. The subject-matter of claims 1-4 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 in that one HVR, e.g. HVR-H2 is defined by a specific sequence. An unexpected or surprising effect is not shown being based on any of said sequence. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative anti-FcRH5 antibody. The production of an antibody directed against a known antigen falls under the routine practice of the skilled person. Therefore, the subject-matter of claims 1-4 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT. Same applies to the

subject-matter of claims 23, and 46-48 referring to the polynucleotide encoding the antibody of claim 1, a vector and a host cell. Claims 57-59 referring to the antibody of claim 1 and claims 67-96 referring to the use of said antibody in therapy or diagnostic are not considered inventive for the same reasons. Same applies to the subject-matter of claims 162-163 referring to a composition comprising the antibody of claim 1. With respect to claim 172 being dependent on claim 67, it is noted that further contacting a cell with another therapeutic agent, e.g. those defined in claims 179 and 180 which are known in the field, is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT. Same applies to claims 173/181/182, 174/183/184, 175/185/186, 176/187/188, 177/189/190, 178/191/192.

V.3.2 With respect to claims 11-16

The humanized antibodies claimed in claims 11-16 are defined by the affinity in its bivalent form to human FcRH5, i.e. 0.4 nM, 0.2 nM, 0.5 nM. The subject-matter of claims 11-16 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 in that an antibody having a specific affinity to human FcRH5, wherein said affinity is increased of 5 to 10 fold compared compared to the affinity of the antibodies described in D1, D4 and D5. The production of antibodies having increased binding affinities within the range of 5 to 10 fold falls under the routine practice of the skilled person. Therefore, the subject-matter of claims 11-16 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.3 With respect to claims 19 and 20

The subject-matter of claims 19 and 20 refers to anti-FcRH5 antibodies of claim 1 comprising human kappa subgroup I consensus FR sequence or heavy chain human subgroup III consensus FR sequence (claims 19 and 20). The subject-matter of claims 19 and 20 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 in that specific framework sequences are used. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative antibody. The subject-matter of claims 19 and 20 appears to be a random selection from the possible human sequences which the skilled person is aware of and would consider equally. Therefore, the subject-matter of claims 19 and 20 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.4 With respect to claims 30 and 31

The subject-matter of claims 30 and 31 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 and D5 in that a polypeptide comprising a specific amino acid sequence is claimed. The technical problem to be solved may be regarded as

providing a further polypeptide. Said claims are not limited to an antibody binding to FcRH5. The provision of a further polypeptide is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.5 With respect to claims 24-29, 32-34

The binding specificity or epitope of the antibodies claimed in claims 24-29, 32-34 is not defined. Said claims differ from each of D1-D5 in that an antibody is defined by a subsequence. The technical problem may be regarded as providing a further antibody (with undefined specificity). The provision of a further antibody is not considered inventive (Article 33(3) PCT).

V.3.6 With respect to claims 35-45

The subject-matter of claims 35-45 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 in that the sequence of the anti-FcRH5 antibody is defined in more detail, e.g. being at least 90% identical to the heavy chain or light chain of 10A8 or comprising at least one specific FR sequence. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative anti-FcRH5 antibody. The provision of a further anti-FcRH5 antibody falls under the routine work of the skilled person. Therefore, the subject-matter of claims 35-45 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.7 With respect to claims 52-56 and 169-171

The anti-FcRH5 antibodies described in D1-D5 bind to FcRH5 expressed on the surface of non-neoplastic B cells and of neoplastic B cells. The technical problem to be solved is the same as formulated for the subject-matter of claims 1-4 (see V.3.1 above). Consequently, the subject-matter of claims 52-56 and 162-171 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.8 With respect to claim 60

The subject-matter of claim 60 refers to an antibody which binds to the same epitope as an antibody comprising a VH (SEQ ID NO. 21) and VL (SEQ ID NO. 19). Furthermore, this antibody is structurally defined by at least one of six HVR sequences. The subject-matter of claim 60 differs from each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 in that an antibody binding a specific epitope is described wherein said antibody is partially defined by a subsequence. The epitope is not structurally defined by its amino acid sequence or localization in the FcRH5 molecule. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative antibody. The provision of a further or alternative antibody is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.9 With respect to claims 61-66

Claims 61-66 refers to an immunoconjugate comprising an antibody of claim 1. Documents D1, D4 and D5 describe immunoconjugates comprising an anti-IRTA2 antibody conjugated to a toxin. The difference of claims 61 and 62 lies in the sequence of the anti-IRTA2 antibody. This is not considered inventive in the sense of Article 33(3) EPC (see V.3.1 above). Closest prior art document D4 describes immunoconjugates comprising an anti-IRTA2 antibody conjugated to auristatin or maytansines (p. 41 4th paragraph), wherein SPDP and SMCC are described as cross-linking agents in the context of bispecific antibodies (p. 46 1st paragraph). The subject-matter of claims 63-66 differs from D4 in that the sequence of the anti-IRTA2 antibody is different and the linker used. The technical problem to be solved may be regarded as providing an alternative immunoconjugate. In the light of D4 combined with D8, this is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.10 With respect to claims 97-161 and 166-168

The subject-matter of claims 97-161 and 166-168 refers to a cysteine engineered antibody wherein the parent antibody is an antibody of claim 1. In the light of each of the closest prior art documents D1, D4 or D5 combined with the teaching of D9, the subject-matter of claims 97-161 and 166-168 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT, since the antibodies referred to in claims 97-161 and 166-168 are considered being alternative antibodies.

V.3.11 With respect to claims 193-199

Document D4 describes bispecific antibodies directed against IRTA2 and CD3 (p. 44 2nd paragraph). Therefore, the argumentation as outlined under V.3.1 above applies also the claims 193 and 194. Furthermore, none of the features of claims 195-199 renders the subject-matter of said claims inventive of the prior art document D4.

V.3.12 With respect to claim 164

The subject-matter of claim 164 refers to antibodies having at least 90% sequence identity to the murine antibody designated 10A8 (SEQ ID NO. 18 and 20). The subject-matter of claim 164 differs from each of the closest prior art documents D1, D4, or D5 in that the antibody is defined by a different amino acid sequence. An unexpected or surprising effect is not shown being based on the sequence as defined in claim 164. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative anti-FcRH5 antibody. The provision of a further or alternative antibody falls under the routine work of the skilled person. Therefore, the subject-matter of claim 164 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.3.13 With respect to claim 165

In case the antibody described in D10 is not identical with the antibody as defined in claim 165 following argumentation applies: The subject-matter of claim 165 refers to antibodies having at least 90% sequence identity to the murine antibody designated 7D11 (SEQ ID NO. 13 and 11). The subject-matter of claim 165 differs from each of the closest prior art documents D1, D4, or D5 in that the antibody is defined by a different amino acid sequence. An unexpected or surprising effect is not shown being based on the sequence as defined in claim 165. The technical problem to be solved may be regarded as providing a further or alternative anti-FcRH5 antibody. The provision of a further or alternative antibody falls under the routine work of the skilled person. Therefore, the subject-matter of claim 165 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

V.4.1 With respect to claims 1-199

The subject-matter of claims 1-199 appears to be susceptible of industrial application.

V.5 Further remarks

V.5.1 With respect to claims 67-88, 90, 94-96, 144, 145, 147-149

The subject-matter of claims 67-88, 90, 94-96, 144, 145, 147-149 is considered to be a method of treatment by therapy of the human or animal body.

For the assessment of the present claims 67-88, 90, 94-96, 144, 145, 147-149 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Patentability, in particular novelty and inventive step, of claims 67-88, 90, 94-96, 144, 145, 147-149 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

V.5.2 With respect to claims 24-29, 32-34, 50, and 51

The binding specificity of the antibodies claimed in claims 24-29, 32-34, 50, and 51 is not defined (neither the antigen nor the epitope). However, the application as originally filed describes antibodies binding to FcRH5/IRTA2. Antibodies binding antigens other than FcRH5/IRTA2 are not supported by the application (Article 6 PCT). The binding

specificity is defined by both the VH chain comprising three HVRs and the VL chain comprising three HVRs. Therefore, claims 24-29, 32-34, 50, and 51 do not contain all essential features (Article 6 PCT).

V.5.3 With respect to claim 63

The subject-matter of claim 63 refers to the formula Ab-(L-D)p, wherein p is not defined. Therefore, the subject-matter of claim 63 is unclear in the sense of Article 6 PCT.

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

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

BNSDOCID: <XS 20070401OCK 1 >

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

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

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

XS CPRIENFRDE

BNSDOCID: <XS 2008100103CF 1 >

ANTICUERPOS ANTI–FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en los mamíferos y a los métodos que usan estas composiciones para lo mismo.

SECTOR: Inmunoglobulinas, por ejemplo anticuerpos monoclonales o policlonales, contra receptores, antígenos de superficie celular o determinantes de superficie celular; preparaciones medicinales que contienen dichas inmunoglobulinas; agentes antineoplásicos específicos para leucemia; células humanas, animales o de plantas modificadas mediante la introducción de material genético extraño; péptidos híbridos.

ANTICUERPOS ANTI-FcRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad bajo Sección 119(e) y el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos Serie No 61/211.695 presentada el 1 de abril de 2009, 61/166.217 presentada el 2 de abril de 2009, y 61/266.972 presentada el 4 de diciembre de 2009, cuyas descripciones completas se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que sido remitido por medio EFS-Web y se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 10 de febrero de 2010, se denomina PR51142.txt, y es de 85,281 bits de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para el tratamiento del tumor hematopoyético en mamíferos y a los métodos de usar estas composiciones del tema para lo mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, después de la enfermedad cardíaca (Boring et al., *CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993)). El cáncer se caracteriza por el aumento de células anormales o neoplásicas derivadas de un tejido normal que prolifera para formar una masa tumoral, la invasión de los tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas y la generación de células malignas que finalmente se diseminan por medio de la sangre o el sistema linfático a los ganglios linfáticos y a sitios distantes por un proceso llamado metástasis. En un estado canceroso,

una célula prolifera en r condiciones en que las células normales no pueden crecer. El cáncer se manifiesta en una amplia variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad.

Los cánceres que involucran células generadas durante la hematopoyesis, un proceso por el que se generan los elementos celulares de la sangre, tales como linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células citolíticas naturales se denominan como cánceres hematopoyéticos. Los linfocitos que se pueden hallar en la sangre y el tejido linfático y son críticos para la respuesta inmune se categorizan en dos clases principales de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T), que median la inmunidad humoral y mediada por células, respectivamente.

Las células B maduran dentro de la médula ósea y dejan la médula expresando un anticuerpo de unión al antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B inactiva se encuentra primero con el antígeno para el que su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula comienza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras llamadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una vida más larga y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula progenitora original. Las células plasmáticas no producen anticuerpo unido a membrana pero en cambio producen el anticuerpo en una forma que se puede secretar. Los anticuerpos secretados son la principal molécula efectora de la inmunidad humoral.

Las células T maduran en el timo que provee un ambiente para la proliferación y diferenciación de las células T inmaduras. Durante la maduración de las células T, las células T experimentan reordenamientos génicos que producen el receptor de las células T y la selección positiva y negativa que ayuda a determinar el fenotipo de superficie celular de las células T maduras. Los marcadores de superficie celular característicos de las células T maduras son el complejo del receptor CD3:células T y uno de los correceptores, CD4 o CD8.

En los intentos de descubrir los blancos celulares efectivos para la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos de transmembrana o asociados de otro modo a membrana que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas no normales. Con frecuencia, dichos polipéptidos asociados a membrana están expresados más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos del antígeno de superficie celular asociados al tumor ha originado la capacidad de las células cancerosas de dirigirse específicamente para la destrucción por medio de terapias basadas en el anticuerpo. En este aspecto, se advierte que la terapia basada en anticuerpos ha demostrado ser muy efectiva en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han usado exitosamente para tratar cáncer de mamas y linfoma no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del proto-oncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). La sobreexpresión de proteínas de HER2 se observa en 25–30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano manipulado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 que se halla en la superficie de los linfocitos B normales y malignos. Estos anticuerpos se producen en forma recombinante en las células CHO.

En otros intentos para descubrir blancos celulares efectivos para la terapia de cáncer, los investigadores han buscado identificar (1) polipéptidos no asociados a membrana que sean producido específicamente por uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con uno o más tipos particulares de células normales no cancerosos, (2) polipéptidos que son producidos por células cancerosas

con un nivel de expresión que es significativamente superior que de el de una o más células no cancerosas normales, o (3) polipéptidos cuya expresión es específicamente limitado a solo un tipo de tejido único (o muy limitado número de diferentes) en estado canceroso y no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y tumor de próstata). Dichos polipéptidos pueden permanecer ubicados en forma intracelular o pueden ser secretados por la célula cancerosa. Además, dichos polipéptidos pueden no estar expresados por la célula cancerosa misma, sino más bien por las células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o mejorador del crecimiento sobre las células cancerosas. Dichos polipéptidos secretados a menudo son proteínas que proporcionan células cancerosas con una ventaja de crecimiento respecto de las células normales e incluyen cosas tales como, por ejemplo, factores angiogénicos, factores de adhesión celular, factores de crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de los antagonistas de dichos polipéptidos no asociados a membrana permita obtener agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento de dichos cánceres. Por otra parte, la identificación del patrón de expresión de dichos polipéptidos puede ser de utilidad para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

A pesar de los avances anteriormente identificados en la terapia del cáncer de mamíferos, existe una gran necesidad de agentes terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de tumor en un mamífero y para inhibir efectivamente el crecimiento de células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención identificar polipéptidos, polipéptidos asociados a la membrana celular, secretados o intracelulares cuya expresión está limitada específicamente a solo un tipo de tejido único (o muy limitado número de diferentes), tejidos hematopoyéticos, tanto en estado canceroso como no canceroso y al uso de estos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificadores, para producir composiciones del tema

útiles en el tratamiento terapéutico y/o detección del cáncer hematopoyético en los mamíferos.

Las anormalidades del cromosoma 1q21 son comunes en las neoplasias de células B, que incluyen linfoma de células B y mieloma, pero los genes dirigidos por estas aberraciones son muy conocidos. Las anormalidades cromosómicas que involucran la banda 1q21–q23 están entre las lesiones genéticas más frecuentes en linfoma no Hodgkin de células B y el mieloma múltiple. Entre los subtipos de linfoma no Hodgkin, se han informado los puntos de ruptura de la translocación en 1q21–q23, que incluyen translocaciones y duplicaciones, con frecuencia como anormalidad cromosómica única en el linfoma de células B folicular y difuso de células grandes (DLCL) en el linfoma de células B de zona marginal y en el linfoma de Burkitt. Por clonación de los puntos de ruptura de una translocación cromosómica t(1:14)(q21:q32) en una línea celular de mieloma, se identificaron dos genes, denominados receptores de translocación asociados de la superfamilia de inmunoglobulina (IRTA) 1 e IRTA2. IRTA2 es idéntico a las secuencias identificadas como BXMAS1 (Nakayama et al., Biochm. Biophys. Res. Commun. 285:830–7, 2001) y FcRH5 (Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9772–7, 2001). Tanto IRTA1 como IRTA2 son miembros de una familia de genes relacionados, la IRTA.

FcRH5 (o IRTA2) es un receptor de superficie celular con homologías con las familias del receptor de Fc. Se expresa normalmente en las células B maduras, y tiene una distribución diferente en los órganos linfoides periféricos que FcRH4 (IRTA1). IRTA1 se expresa en las células B de la zona marginal, mientras que IRTA2 también se expresa en los centrocitos del centro germinal y en los inmunoblastos. La expresión de IRTA2 está desregulada en el mieloma múltiple y las líneas celulares del linfoma de Burkitt con anormalidades de 1q21 (ver Miller et al., Blood 99:2662–2669, 2002). La alta frecuencia del compromiso de los reordenamientos estructurales de 1q21 en las neoplasias de células B sugiere que IRTA1 e IRTA2 son críticos para la patogénesis de estas

enfermedades (ver solicitud publicada de PCT No. WO 01/38490; solicitud de patente publicada U.S. No. 20080292632, cuyos contenidos están incorporados por referencia en la presente) (ver también Polson, *et al.* Int Immunol. 2006 Sep;18(9):1363–73).

Dada la expresión de FcRH5, es beneficioso producir anticuerpos terapéuticos para este antígeno de FcRH5 que crean antigenicidad mínima o ninguna cuando se administran a los pacientes, en especial para el tratamiento crónico. La presente invención satisface estas y otras necesidades. La presente invención proporciona anticuerpos anti–FcRH5 que superan las limitaciones de las composiciones terapéuticas actuales así como ofrece ventajas que serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

El uso de conjugados del anticuerpo–fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543–549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137–1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207–212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605–614; Niculescu–Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151–172; US 4975278) permite la administración dirigida del residuo de fármaco a los tumores, y la acumulación intracelular en ella, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados pueden producir niveles inaceptables de toxicidad a las células normales así como se eliminan las células tumorales buscadas (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603–05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Citotoxic agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Anticuerpos '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475–506). Los esfuerzos para mejorar el índice terapéutico, es decir, la máxima eficacia y mínima toxicidad de ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos policlonales (Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183–87) y monoclonales (mAb) así como las

propiedades un unión al fármaco y liberación del fármaco (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543–549). Los residuos de fármacos usados en los conjugados de anticuerpo y fármaco incluyen toxinas de proteínas bacterianas tales como toxina de la difteria, toxinas de proteínas vegetales tales como ricina, moléculas pequeñas tales como auristatinas, geldanamicina (Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573–1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025–1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786–791), maytansinoides (EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618–8623), calicheamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336–3342), daunomycin, doxorrubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al (1986) *supra*). Los residuos del fármaco pueden afectar los mecanismos citotóxicos y citostáticos que incluyen unión a tubulina, unión al ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o ligandos del receptor de proteínas.

Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina (WO 02/088172), se han conjugado como residuos de fármacos a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en neoplasias hematológicas (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765–773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778–784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458–1465; US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti–CD20 tales como rituxan (WO 04/032828) para el tratamiento de los cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunes; (iv) anticuerpo anti–EphB2R 2H9 para el tratamiento de cáncer colorrectal (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781–788); (v) anticuerpo de E–selectina (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387–6394); (vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, US 2005/0238649), y (vi) anticuerpos anti–CD30 (WO 03/043583). Las variantes de auristatina E se describen en US

5767237 y US 6124431. La monometil auristatina E conjugada a los anticuerpos monoclonales se describen en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004. Los análogos de auristatina MMAE y MMAF se han conjugado a varios anticuerpos (US 2005/0238649).

Los medios convencionales de unión, es decir, ligadura mediante enlaces covalentes, de un residuo de fármaco a un anticuerpo generalmente produce una mezcla heterogénea de moléculas donde los residuos del fármaco se fijan a numerosos sitios del anticuerpo. Por ejemplo, los fármacos citotóxicos normalmente se han conjugado a un anticuerpo a través de residuos de lisina menos frecuentes de un anticuerpo, lo que genera una mezcla heterogénea del conjugado de anticuerpo y fármaco. De De acuerdo con las condiciones de reacción, la mezcla heterogénea normalmente contiene una distribución de anticuerpos de 0 a aproximadamente 8, o más, residuos fármacos unidos. Además, dentro de cada subgrupo de conjugados con una relación entera particular de residuos de fármaco al anticuerpo, es una mezcla potencialmente heterogénea donde el residuo de fármaco se une a varios sitios del anticuerpo. Los métodos analíticos y preparativos pueden ser inadecuados para separar y caracterizar el conjugado de las moléculas de especie anticuerpo y fármaco dentro de la mezcla heterogénea resultante de una reacción de conjugación. Los anticuerpos son biomoléculas grandes, complejas y estructuralmente diversas, a menudo con muchos grupos funcionales reactivos. Su reactividad con los reactivos ligadores y el intermediario fármaco-ligadores depende de factores tales como pH, concentración, concentración de sal y cosolventes. Además, el proceso de conjugación de etapas múltiples puede ser no reproducible debido a las dificultades para controlar las condiciones de reacción y caracterización de reactantes e intermediarios.

Los tioles de la cisteína son reactivos a pH neutro, a diferencia de la mayoría de las aminas que se protonan y menos nucleofílicos cerca del

pH 7. Debido a que los grupos tiol libres (RSH, sulfhidrilo) son relativamente reactivos, las proteínas con residuos de cisteína a menudo existen en su forma oxidada como oligómeros unidos por disulfuro o tienen grupos disulfuro con puentes internos. Las proteínas extracelulares generalmente no tienen tioles libres (Garman, 1997, Non–Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, en página 55). Los grupos tiol de la cisteína del anticuerpo generalmente son más reactivos, es decir, más nucleofílicos, hacia los reactivos de conjugación electrofílicos que los grupos amino o hidroxilo del anticuerpo. Los residuos de cisteína se han introducido en las proteínas por técnicas de ingeniería genética para formar uniones covalentes a los ligandos o para formar nuevos enlaces disulfuros intramoleculares (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644–9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126–132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247–255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862–4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207–214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480–8484; US 6248564). Sin embargo, la manipulación genética de los grupos tiol de la cisteína por la mutación de varios residuos de aminoácidos de una proteína a aminoácidos de cisteína es potencialmente problemática, particularmente en el caso de residuos no apareados (Cys libre) o los que son relativamente accesibles para la reacción u oxidación. En las soluciones concentradas de la proteína, si en el periplasma de E. coli, los sobrenadantes del cultivo, o la proteína purificada en forma parcial o completa, los residuos de Cys no apareados en la superficie de la proteína se pueden aparear y oxidar para formar disulfuros intermoleculares, y en consecuencia dímeros o multímeros de proteína. La formación de dímeros de disulfuro produce nueva Cys no reactiva para la conjugación a un fármaco, ligando u otra marca. Además, si la proteína forma por oxidación un enlace disulfuro intramolecular entre la Cys recién manipulada genéticamente y un residuo de Cys existentes, ambos grupos tiol de la Cys no están disponibles para la participación y las interacciones en el sitio activo. Por otra parte, la proteína se puede

volver inactiva o no especifica, por mal plegado o pérdida de la estructura terciaria (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1–9).

Los anticuerpos manipulados genéticamente en la cisteína se han diseñado como fragmentos de anticuerpo FAB (tioFab) y se expresan como anticuerpos monoclonales IgG de longitud completa (tioMab) (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41–52; US 2007/0092940, cuyos contenidos se incorporan por referencia). Los anticuerpos TioFab y TioMab se han conjugado mediante ligadores en los tioles de la cisteína recién introducidos con agentes ligadores reactivos con tiol y ligadores reactivos con el fármaco para preparar conjugados de anticuerpo y fármaco (Tio ADC).

Todas las referencias mencionadas en la presente, que incluyen solicitudes de patente y publicaciones, se incorporan por referencia en su totalidad.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona anticuerpos anti–FcRH5 o fragmentos funcionales de estos, y sus métodos de uso en el tratamiento de los tumores hematopoyéticos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une, con preferencia específicamente, a cualquiera de los polipéptidos anteriores o que se describen a continuación. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, que incluye Fab, Fab', $F(ab')_2$, y fragmento de Fv, diacuerpo, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena simple o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5 a su epitope anntigénico respectivo. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tales como una toxina, que incluye, por ejemplo, una auristatina, un maytansinoide, un derivado de dolostatina o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden producir

en las células CHO o células bacterianas y con preferencia inducen la muerte de una célula a las que se unen. Para los fines de detección, los anticuerpos de la presente invención se puede marcar en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento Fab al FcRH5) o afinidad en su forma bivalente del anticuerpo al FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como un fragmento de IgG al FcRH5) es sustancialmente igual, menor o mayor que la afinidad monovalente o la afinidad en su forma bivalente, respectivamente, de un anticuerpo humano (por ejemplo afinidad del anticuerpo humano como fragmento Fab o como fragmento de IgG al FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento Fab o como un fragmento de IgG al FcRH5), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 19) y la Figura 10 (SEQ ID NO:21).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como IgG al FcRH5) es 0,4 nM, 0,2 nM o 0,5 nM.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas del grupo que consiste en:

(i) HVR–L1 que comprende la secuencia KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR–L2 que comprende la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii)HVR–L3 que comprende la secuencia QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR–H1 que comprende la secuencia GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR–H2 que comprende la secuencia ATISSGGSLTFILDSVR (SEQ ID NO: 36); y

(vi) HVR–H3 que comprende la secuencia PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37). En otra forma de realización, la HVR–H2 tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 36. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende secuencia estructural de consenso del subgrupo 1 κ humana. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende la secuencia estructural de consenso de la cadena pesada del subgrupo III. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 19.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 21. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 19.

En otra forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 21. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales seleccionadas de las SEQ ID NOs: 31, 32, 33 y 34. En otras formas de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales seleccionadas de las SEQ ID NOs: 22, 23, 24 y 25. En otra forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un aminoácido seleccionado de las SEQ ID NOs: 31, 32, 33 y 34. En otras formas de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que

comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un aminoácido seleccionado de las SEQ ID NOs: 22, 23, 24 y 25.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende al menos una variante de HVR en donde la secuencia de la variante de HVR comprende la modificación de al menos un residuo de la secuencia descripta en las SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 35, 36 o 37. En otra forma de realización, la modificación es sustitución, inserción o supresión.

En otra forma de realización, al menos una porción de la secuencia estructural es una secuencia estructural de consenso humana.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo humano que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 19) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 21).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino o quimérico que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 19) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 21).

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor que afinidad monovalente de un anticuerpo murino o quimérico que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena

pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es sustancialmente la misma que la afinidad de un anticuerpo humano en su forma bivalente y que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que la afinidad de un anticuerpo murino o quimérico en su forma bivalente y que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor que la afinidad de un anticuerpo murino o quimérico en su forma bivalente que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,4 nM. En una forma de realización, la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,4 nM +/– ,04.

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,2 nM. En una forma de realización, la

afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,2 nM +/– ,02.

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,5 nM. En una forma de realización, la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,5 nM +/– ,01.

En todos los aspectos, la afinidad de unión se expresa como un valor de Kd. En otro aspecto, la afinidad de unión se mide por Biacore o radioinmunoensayo.

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde el anticuerpo humanizado cuando se conjuga a un agente citotóxico inhibe el crecimiento de las células tumorales.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde el anticuerpo humanizado cuando se conjuga a un agente citotóxico inhibe el crecimiento de las células tumorales.

En una forma de realización, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico son monovalentes o bivalentes. En otra forma de realización, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico comprenden una región de Fab única ligada a una región de Fc.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, HVR2–HC y/o HVR3–HC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 35–37). En una forma de realización, el dominio variable comprende la secuencia de FR1–HC, FR2–HC, FR3–HC y/o FR4–HC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 31–34). En otra forma de realización, el anticuerpo comprende la secuencia de CH1 y/o Fc que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 38 y/o 39).

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende

la secuencia de HVR1–LC, HVR2–LC y/o HVR3–LC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 26–28). En una forma de realización, el dominio variable comprende la secuencia de FR1–LC, FR2–LC, FR3–LC y/o FR4–LC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 22–25). En otra forma de realización, el anticuerpo comprende la secuencia de CL1 que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 29).

En un aspecto, la invención proporciona a polipéptido que comprende la secuencia que se ilustra en la Figura 10 (SEQ ID NO: 21). En otro aspecto, la invención proporciona a polipéptido que comprende la secuencia que se ilustra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 19).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo obtenido por el proceso de (a) cultivar una célula que expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada descripta en la presente y un dominio variable de la cadena liviana descripta en la presente; y (b) aislar el anticuerpo de dicha célula cultivada.

En un aspecto diferente, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada descripta en la presente y un dominio variable de la cadena liviana descripta en la presente. En una forma de realización, el anticuerpo es monovalente y comprende una región de Fc.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo descripto en la presente. En una forma de realización, la invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En otra forma de realización, la invención proporciona una célula huésped que comprende el vector.

En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre y una secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 251–298. El anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína se puede unir un polipéptido de FcRH5. El anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína se puede preparar por un

proceso que comprende reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 original por cisteína.

En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre en donde el anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína se une a un polipéptido de FcRH5 y se prepara por a process que comprende replacing uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 original por cisteína en donde el anticuerpo original comprende al menos una secuencia de HVR seleccionada de:

(i) HVR–L1 que comprende la secuencia KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR–L2 que comprende la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii)HVR–L3 que comprende la secuencia QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR–H1 que comprende la secuencia GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR–H2 que comprende la secuencia ATISSGGSLTFILDSVR (SEQ ID NO: 36); y

(vi) HVR–H3 que comprende la secuencia PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37).

El anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena simple o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5 a su respectivo epitope antigénico. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tales como una toxina, que incluye, por ejemplo, una auristatina o maytansinoide. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden producir en células CHO o células bacterianas y con preferencia inhiben el crecimiento o la proliferación o induce la muerte de una célula a la que se

unen. Para fine diagnósticos, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

En un aspecto, la invención proporciona los métodos para obtener un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método de obtener un anticuerpo de FcRH5 (que, como se define en la presente incluye longitud completa y fragmentos de este), dicho método que comprende expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento de este), y recuperar dicho anticuerpo.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico capaz de unirse a una primera célula que expresa FcRH5 y a una segunda célula que expresa un antígeno blanco de la superficie celular. En una forma de realización, la segunda célula es una célula T. En una forma de realización, el antígeno blanco de la superficie celular es CD3. En ciertas formas de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de protuberancia dentro de la cavidad. En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico es aglicosilado. En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico se produce en una célula huésped de *Escherichia coli*. En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico carece de una o más funciones efectoras de Fc. En una forma de realización, el anticuerpo biespecífico carece de actividad ADCC.

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

En un aspecto, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende uno o más anticuerpos FcRH5 de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o

más anticuerpos FcRH5 de la invención; y un segundo recipiente que comprende un buffer.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de FcRH5 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como a cáncer, a tumor y/o un trastorno proliferativo celular.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de manufactura de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular.

En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibir el crecimiento de una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con un anticuerpo de la invención de este modo causa una inhibición del crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se trata efectivamente a dicho mamífero. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con aumento de expresión de FcRH5, dicho método que comprende administrar a un

sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se trata o previene efectivamente dicho trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula, en donde el crecimiento d dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se inhibe el crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se trata efectivamente dicho tumor. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar cáncer que comprende administrar a un paciente la formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado descripto en la presente, y un diluyente, vehículo o excipiente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibir la proliferación de las células B que comprende exponer una célula a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a FcRH5.

Los métodos de la presente invención además pueden comprender etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una forma de realización, un método que además comprende una etapa en donde una célula y/o tejido específico (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a un tratamiento de radiación o a un agente quimioterapéutico.

En un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti–FcRH5 en combinación con una cantidad efectiva de otro agente terapéutico (tales como un agente antiangiogénesis, otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento). Por ejemplo, los anticuerpos anti–FcRH5 o inmunoconjugados se usan en combinaciones con un agente anticáncer o un agente antiangiogénico para tratar varias afecciones neoplásicas o no neoplásicas. En ejemplos particulares, los anticuerpos anti–FcRH5 se usan en combinación con Velcade® (bortezomib) , Revlimid® (lenalidomida), tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, bevacizumab, vincristina, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, dexametasona, melfalina, prednisona, vincristina, talidomida.

De acuerdo con la indicación de cáncer específico tratado, la terapia de combinación de la invención se puede combinar con agentes terapéuticos adicionales, tales como agente quimioterapéuticos, o terapias adicionales tales como radioterapia o cirugía. Se pueden usar muchos agentes quimioterapéuticos en la terapia de combinación de la invención. Con preferencia se usarán los agentes quimioterapéuticos que son estándares para el tratamiento de las indicaciones específicas. La dosificación o frecuencia de cada agente terapéutico que se usa en la combinación con preferencia igual, o menor que la dosificación o

frecuencia del agente correspondiente cuando se usa sin los otros agentes.

En otro aspecto, la invención proporciona alguno de los anticuerpos anti–FcRH5 descriptos en la presente, en donde el anticuerpo anti–FcRH5 comprende una marca detectable.

En un aspecto, la invención proporciona un método de determinar la presencia de FcRH5 en una muestra que se sospecha que contiene FcRH5, dicho método que comprende exponer dicha muestra a un anticuerpo de la invención, y determinar la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra en donde la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra es indicativo de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnosticar un trastorno proliferativo celular asociado con un aumento de las células, tales como células B, que expresan FcRH5, el método que comprende poner en contacto las células de ensayo en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a las células de ensayo en la muestra por la detección de la unión del anticuerpo a FcRH5; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra control, en donde el nivel de anticuerpo unido se normaliza a la cantidad de células que expresan FcRH5 en las muestras de ensayo y control, y en donde un nivel superior de anticuerpo unido en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan FcRH5.

En un aspecto, la invención proporciona un método de detectar FcRH5 soluble en sangre o suero, el método que comprende poner en contacto una muestra de ensayo de sangre o suero de un mamífero que se sospecha que experimenta un trastorno proliferativo de las células B con un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención y detectar un aumento de FcRH5 soluble en la muestra de ensayo con respecto a una muestra control de sangre o suero de un mamífero normal.

En un aspecto, la invención proporciona un método de unir un anticuerpo de la invención a una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con un anticuerpo de la invención. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la cadena liviana de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (ADN).

La Figura 2 representa la cadena liviana de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (aminoácido).

La Figura 3 representa la cadena pesada de FcRH5 7D11anti-humano quimérico (ADN).

La Figura 4 representa la cadena pesada de FcRH5 7D11anti-humano quimérico (aminoácido).

La Figura 5 representa la cadena liviana de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico (ADN).

La Figura 6 representa la cadena liviana de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico (aminoácido).

La Figura 7 representa la cadena pesada de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico (ADN).

La Figura 8 representa la cadena pesada de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico (aminoácido).

La Figura 9 muestra el alineamiento de las cadenas livianas variables para 10A8 murino y 10A8v1 humanizado con dominio de VL kappa de consenso humana (huKI) (SEQ ID NO: 64).

La Figura 10 muestra el alineamiento de las cadenas pesadas variables para 10A8 murino y 10A8v1 humanizado con dominio de VH del subgrupo de consenso humano (huIII) (SEQ ID NO: 65).

La Figura 11 muestra las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de la invención (Hu10A8 v1)

La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos de cadenas del polipéptido manipulado genéticamente en cisteína de un tio–Mab de la invención.

La Figura 13 muestra las secuencias de aminoácidos de cadenas del polipéptido manipulado genéticamente en cisteína de un tio–Mab de la invención.

La Figura 14 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos FcRH5.

La Figura 15 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos FcRH5.

La Figura 16 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos FcRH5.

La Figura 17 muestra el análisis de FACS de los anticuerpos FcRH5.

La Figura 18 muestra la titulación del anticuerpo de FcRH5.

La Figura 19 muestra la titulación del anticuerpo de FcRH5.

La Figura 20 muestra el análisis de FACS de un tio–Mab de la invención.

La Figura 21 muestra el análisis de FACS de un tio–Mab de la invención.

La Figura 22 muestra el análisis de FACS de un tio–Mab de la invención.

La Figura 23 muestra el análisis de FACS de un tio–Mab de la invención.

La Figura 24 muestra el análisis de FACS de un anticuerpo conjugado de la invención.

La Figura 25 muestra el análisis de FACS de un anticuerpo conjugado de la invención.

La Figura 26 muestra el efecto de los anticuerpos de la invención sobre el volumen tumoral medio.

La Figura 27 muestra el efecto de los anticuerpos de la invención sobre el peso corporal medio.

La Figura 28 muestra el efecto de los anticuerpos de la invención sobre el volumen tumoral medio.

La Figura 29 muestra el efecto de los anticuerpos de la invención sobre el peso corporal medio.

La Figura 30a muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el volumen tumoral medio.

La Figura 30b muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el peso corporal medio.

La Figura 31 muestra un análisis de dosis respuesta del compuesto único.

La Figura 32 muestra un análisis de dosis respuesta del compuesto único.

La Figura 33 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 58) de un ADNc de PRO820, en donde SEQ ID NO: 58 es un clon denominado en la presente como "ADN56041–1416" (también denominado aquí como "FcRH5"). La secuencia de nucleótidos codifica para FcRH5 los codones de comienzo y detención se muestran en negrita y subrayados. (Ver Goddard et al. Patente U.S. No. 7491529).

La Figura 34 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) derivada de la secuencia codificadora de la SEQ ID NO: 59 que se muestra en la Figura 33. (Ver Goddard et al. Patente U.S. No. 7491529).

La Figura 35A–B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:602) de un ADNc de PRO52387, en donde la SEQ ID NO: 60 es un clon denominado en la presente como "ADN257845" (también denominado aquí como "FcRH5"). La secuencia de nucleótidos codifica para FcRH5 los codones de comienzo y detención se muestran en negrita y subrayados (Ver Chang et al. Solicitud de patente publicada U.S. No. 20060251662).

La Figura 36 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) derivada de la secuencia codificadora de la SEQ ID NO: 61 que se muestra en la Figura 36A–B (Ver Chang et al. Solicitud de patente publicada U.S. No. 20060251662).

La Figura 37 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:62) de un ADNc de PRO314992, en donde la SEQ ID NO: 62 es un clon denominado en la presente como "ADN676969" de mono cynomologous (también denominado en la presente como "cyno FcRH5").

La Figura 38 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 63) derivada de la secuencia codificadora de la SEQ ID NO: 63 que se muestra en la Figura 37.

La Figura 39 muestra el efecto de una administración combinada de un anticuerpo inmunoconjugado y al menos un agente quimioterapéutico sobre el volumen tumoral medio en ratones.

La Figura 40 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal para los animales en cada grupo de dosis.

La Figura 41 muestra el efecto de una administración combinada de un anticuerpo inmunoconjugado y al menos un agente quimioterapéutico sobre el volumen tumoral medio en ratones.

La Figura 42 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal para los animales en cada grupo de dosis.

La Figura 43 muestra el efecto de una administración combinada de un anticuerpo inmunoconjugado y al menos un agente quimioterapéutico sobre el volumen tumoral medio en ratones.

La Figura 44 muestra el porcentaje de cambio de peso corporal para los animales en cada grupo de dosis.

La Figura 45 muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el volumen tumoral medio.

La Figura 46 muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el peso corporal medio.

La Figura 47 muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el volumen tumoral medio.

La Figura 48 muestra el efecto de los conjugados del anticuerpo de la invención sobre el peso corporal medio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de manufactura para identificar composiciones útiles para el tratamiento de tumor hematopoyético en mamíferos y un métodos de uso de estas composiciones para lo mismo.

En la presente se proporcionan detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de manufactura.

I. Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas de biología molecular convencionales (que incluye, técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biología" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

II. Definiciones

Para los fiens de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando fuera apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de cualquier definición expuesta discrepe con algún documento incorporado en la presente por referencia, regirá la definición que se expone a continuación.

Un "marcador de superficie de células B" o "antígeno de superficie de células B" en la presente es un antígeno expresado en la superficie de una célula B que puede ser localizado selectivamente con un antagonista que se une a este, que incluye pero sin limitación, anticuerpos para un antígeno de superficie de células B o una forma soluble de un antígeno de superficie de células B capaz de antagonizar la unión de un ligando al antígeno de células B natural. Los ejemplos de marcadores de superficie de células B incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para descripciones, ver The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edición. 1997, ed. Barclay et al.

Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Otros marcadores de superficie de células B incluyen RP105, FcRH2, células B CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, y 239287. El marcador de superficie de células B de particular interés se expresa con preferencia en las células B en comparación con otros tejidos de células no B de un mamífero y se puede expresar en las células B precursoras y las células B.

El término "FcRH5", como se usa en la presente, se refiere a cualquier FcRH5 nativo de cualquier fuente de vertebrados, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo seres humanos, mono cynomologus (cyno)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. FcRH5 humano también se denomina en la presente como "FcRH518" o "PRO85143" (SEQ ID NO: 2) y está codificado por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) también denominada en la presente como "ADN340394". FcRH5 de cynomologus también se denomina en la presente como "FcRH5 de cyno". El término "FcRH5" abarca FcRH5 no procesado, "de longitud completa" así como cualquier forma de FcRH5 que proviene del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de FcRH5, por ejemplo, variantes de empalme, variantes alélicas e isoformas. Los polipéptidos de FcRH5 descriptos en la presente se pueden aislar de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente o prepararse por métodos recombinantes o sintéticos. Una "polipéptido de FcRH5 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido de FcRH5 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de FcRH5 de secuencia nativa" específicamente abarca formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido de FcRH5 específico (*por ejemplo*, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes naturales (*por*

114

ejemplo, formas empalmadas alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En ciertas formas de realización de la invención, los polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa que se describen en la presente son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras acompañantes. Los codones de comienzo y detención (si se indican) se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácido nucleico indicados como "N" en las figuras acompañantes son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, si bien los polipéptidos de FcRH5 descriptos en las figuras acompañantes se muestran con los residuos de metionina denominado en la presente como posición de aminoácido 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina ubicados corriente arriba o corriente debajo de la posición de aminoácido 1 en las figuras se puede emplear como residuo de aminoácido inicial para los polipéptidos de FcRH5.

"mu10A8" o "MA10A8" o "anticuerpo FcRH5 (10A8) murino" o "anticuerpo anti–FcRH5(10A8) murino" se usa en la presente para referirse específicamente al anticuerpo anti-FcRH5 monoclonal murino en donde el anticuerpo anti-FcRH5 monoclonal murino comprende el dominio variable de la cadena liviana de la SEQ ID NO: 18 (Figura 9) y el dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 20 (Figura 10). El anticuerpo anti-FcRH5 monoclonal murino se puede adquirir en fuentes comerciales.

"ch10A8" o "chMAFcRH5 (10A8)" o "chFcRH5 (10A8)" o "anticuerpo MAFcRH5 (10A8) quimérico" se usa en la presente para referirse específicamente al anticuerpo FcRH5 anti-humano quimérico en donde el anticuerpo anti-FcRH5 quimérico comprende la cadena liviana de la SEQ ID NO: 15 (Figura 6). La cadena liviana de la SEQ ID NO: 15 además comprende un dominio variable que se muestra en la Figura 9 y el dominio constante de la cadena liviana de IgG1 humana. El anticuerpo anti-FcRH5 (10A8) quimérico que además comprende la cadena pesada

de la SEQ ID NO: 17 (Figura 8). La cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 que además comprende un dominio variable que se muestra en la Figura 10 y el dominio constante de la cadena pesada de IgG1 humana.

"ch7D11" o "chMAFcRH5 (7D11)" o "chFcRH5 (7D11)" o "anticuerpo MAFcRH5 (7D11) quimérico" se usa en la presente para referirse específicamente al anticuerpo FcRH5 anti-humano quimérico en donde el anticuerpo anti-FcRH5 quimérico comprende la cadena liviana de la SEQ ID NO: 11 (Figura 2), que comprende el dominio constante de la cadena liviana de la IgG1 humana. El anticuerpo anti–FcRH5 (7D11) quimérico que además comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 13 (Figura 4), que comprende el dominio constante de la cadena pesada de IgG1 humana.

"anti–cynoFcRH5" o "anti–FcRH5 de cyno" se usa en la presente para referirse a los anticuerpos que une al FcRH5 de cyno.

"injerto de 10A8" o "anticuerpo 'humanizado' injertado con 10A8" o "injerto hu10A8" se usa en la presente para referirse específicamente al injerto generado por el injerto de las regiones hipervariables del anticuerpo anti–FcRH5 10A8 murino (mu10A8) en la VL kappa I de consenso humana aceptora (huKI) y VH de consenso subgrupo III humano (huIII) (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)) (Ver Ejemplo 1 y Figura 9 (SEQ ID NO: 19) y 10 (SEQ ID NO: 21)). "hu10A8" o "hu10A8 v1" se usa en la presente para referirse específicamente al anticuerpo 10A8 humanizado.

Una "modificación" de un residuo de aminoácido/posición, como se usa en la presente, se refiere a un cambio de una secuencia de aminoácidos primaria en comparación con una secuencia de aminoácidos inicial, en donde el cambio resulta de una alteración de secuencia que involucra dicho residuo de aminoácido/posiciones. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo (o en dicha posición) con otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservadora o no conservadora), inserción de uno o más (generalmente menos de 5 o 3) aminoácidos adyacentes a dicho residuo/posición, y la supresión de

dicho residuo/posición. Una "sustitución de aminoácidos", o variación de este, se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (inicial) con un residuo de aminoácido diferente. Generalmente y con preferencia, la modificación origina la alteración en al menos una actividad fisicobioquímica de la variante del polipéptido en comparación con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos inicial (o "tipo salvaje"). Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, una actividad fisicobioquímica que se altera puede ser afinidad de unión, capacidad de unión y/o efecto de unión sobre una molécula blanco.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales anti–FcRH5 únicos (que incluye agonista, antagonista, anticuerpos neutralizantes, longitud completa o anticuerpos monoclonales intactos), composiciones de anticuerpo anti–FcRH5 con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que estos exhiben la actividad biológica deseada), formado a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos anti–FcRH5 de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti–FcRH5 (ver más adelante) que incluye los fragmentos de Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, diacuerpos, anticuerpos de dominio único (sdAbs), siempre que estos exhiban la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa en forma indistinta con el anticuerpo en la presente. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madura.

El término "anticuerpo anti–FcRH5" o "un anticuerpo que se une al FcRH5" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a FcRH5 con afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a FcRH5. Con preferencia, el grado de unión de un anticuerpo anti–FcRH5 a una no proteína de FcRH5 no relacionada es menos de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a FcRH5 medido, por ejemplo, por un radioinmunoensayo

(RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une al FcRH5 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o ≤ 0,1 nM. En ciertas formas de realización, el anticuerpo anti–FcRH5 se une a un epitope de FcRH5 que está conservado entre FcRH5 de especies diferentes.

Un "anticuerpo aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos terapéuticos del anticuerpo y puede incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En formas de realización preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry y la máxima preferencia en más del 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencias de aminoácidos N-terminales o internos por el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul Comassie blue o, con preferencia, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en las células recombinantes ya que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo el anticuerpo aislado se preparará por lo menos por un paso de purificación.

La unidad del anticuerpo de 4 cadenas básicas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas livianas idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). (un anticuerpo IgM consisten en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto el polipéptido adicional llamado cadena J, y en consecuencia contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos de IgA secretados se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas básicas es generalmente de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos

cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados por espacios regulares Cada cadena H tiene en el extremo terminal N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo terminal N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se consideran que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena liviana y cadena pesada. El apareamiento de V_H y V_L juntos forma un sitio de unión antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8th edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de algunas especies de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos evidentemente distinto, llamados kappa y lambda, sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, que tienen cadenas pesadas designadas .α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las clases γ y α también se dividieron subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminal de la cadena pesada o liviana del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar como "VH." El dominio variable de la cadena liviana se puede denominar

como "VL". Estos dominios son en general las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión del antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en extensiones relativamente constantes llamadas regiones estructurales (FR) de 15–30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema llamada "regiones hipervariables" que son de 9–12 aminoácidos de largo. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de hoja β, conectadas por tres regiones HVR que forman bucles conectores y, en algunos casos, forman parte de la misma estructura de hoja β. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas muy próximas a las regiones FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

Un anticuerpo "intacto" anticuerpo es uno que comprende un sitio de unión al antígeno así como un C_L y al menos los dominios constantes de la cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (*por ejemplo* dominios constantes de la secuencia nativa humanos) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. Con preferencia, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "anticuerpo desnudo" para los fines de la presente es un anticuerpo que no está conjugado con un resto o radiomarca citotóxica.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, con preferencia que comprende su región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver patente U.S. No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057–1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados de los fragmentos de anticuerpo. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y de este modo retiene la capacidad de unirse al antígeno.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento residual "Fc", una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en la cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión del antígeno, es decir, tiene un solo sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un fragmento $F(ab')_2$ grande único que corresponde aproximadamente a los fragmentos Fab unidos por dos disulfuros que tienen actividad de unión al antígeno divalente y es aún capaz de entrecruzarse con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen pocos residuos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente de Fab' en la que los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos del anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de los fragmentos del anticuerpo también son conocidos.

121

El fragmento de Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por las secuencias de la región Fc, dicha región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de las células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno y de unión completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una cadena liviana en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena liviana se pueden unir covalentemente por un ligador peptídico flexible de modo que las cadenas liviana y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de nua especie Fv de cadena doble. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren la especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unir el antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

"Fv de cadena simple" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una cadena de polipéptido única. Con preferencia, el polipéptido de sFv además comprende un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Anticuerpos, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer–Verlag, New York, pp. 269–315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

El término "diacuerpos" se refiere a los fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, estos fragmentos comprenden un

dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena liviana (VL) en la misma cadena del polipéptido (VH–VL). El pequeño fragmento se prepara por la construcción de fragmentos Fv (ver párrafo precedente) con ligadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se obtiene el apareamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, lo que origina un fragmento a bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos Fv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en cadenas de polipéptidos diferentes. Los diacuerpos se describen con mayor detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444–6448 (1993). Los tricuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, anticuerpos individuales que comprenden poblaciones idénticas excepto en las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epitopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que ellos se pueden sintetizar por el cultivo de hibridoma sin contaminarse con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una oblación de anticuerpos sustancialmente homogéneos, no se interpreta como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo,

los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden preparar por la metodología del hibridoma descripto primero por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o se pueden obtener usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucarióticas, animales o vegetales (ver, por ejemplo, patente U.S. No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpo del fago usando las técnicas descriptas, por ejemplo en Clackson et al., Nature, 352:624–628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581–597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de las cadena(s) es idéntica u homóloga con las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de otra especie particular o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada (ver Patente U.S. No. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851–6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (*por ejemplo* mono del viejo mundo, simio, etc), y la secuencia de la región constante humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo, roedores*) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humana (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especies no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene especificidad, afinidad y/o capacidad

deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados con los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo dador . Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente desempeño del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en que el total o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los una inmunoglobulina no humana, y total o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver Jones et al., Nature 321:522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323–329 (1988); y Presta, Curr. Op. Estruct. Biol. 2:593–596 (1992). Ver también los siguientes artículos de revisión y referencias allí citadas: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105–115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transacciones*, 23:1035–1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428–433 (1994).

"Tio" cuando se usa en la presente se refiere a un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína mientras "hu" cuando se usa en la presente se refiere a un anticuerpo humanizado.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde al de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido obtenido usando cualquiera de las técnicas para obtener anticuerpos humanos como se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de despliegue de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et*

al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos que se describen en Cole *et al.*, *Monoclonal Anticuerpos y Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86–95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368–74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar por la administración del antígeno a un animal transgénico que sido modificado para producir dichos anticuerpos como respuesta al estímulo antigénico, pero cuyos locus han sido desarmados, *por ejemplo*, xenoratones inmunizados (ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nos 6.075.181 y 6.150.584 respecto de la tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) respecto de anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de células B.

El término "región hipervariable," "HVR," o "HV," cuando se usa en la presente se refieren a las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres de la VL (L1, L2, L3). Numerosos diseños de HVR son de utilidad y están abarcadas en la presente. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la ubicación los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El fin del bucle CDR–H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 de acuerdo con la longitud del bucle (esto es porque el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B está presente, los extremos del bucle en 32; si solo 35A está presente, los extremos del bucle a 33; si ambos 35A y 35B están presentes, los extremos del bucle en 34). Las regiones

hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan en el programa de computación del modelo de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las regiones hipervariables "contacto" se basan en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación

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

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas siguientes: 24–36 o 24–34 (L1), 46–56 o 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en la VL y 26–35B (H1), 50–65, 47–65 o 49–65 (H2) y 93–102, 94–102 o 95–102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, supra, para cada una de estas definiciones.

"Estructura" o residuos de "FR" son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable definidos en la presente.

La expresión "numeración del residuo del dominio variable tal como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácido tal como en Kabat," y sus variaciones se refieren al sistema de numeración usadas para el dominio variable de cadena pesadas o dominio variable de cadena

livianas de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra.* , Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, Naciónal Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Mediante este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener pocos o adicionales aminoácidos correspondientes a un acortamiento, o inserción de una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (*por ejemplo* residuos 82a, 82b, y 82c, *etc.* de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la cadena pesada de FR. La numeración de Kabat de residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

El sistema de numeración Kabat generalmente se usa cuando se denomina a un residuo del dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena liviana y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest.* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración de EU" o "índice de EU" se usa generalmente cuando se refiere a un residuo de una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*por ejemplo*, el índice EU informado en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos de los dominios variables del anticuerpo significa la numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique de otro modo en la presente, las referencias a los números de residuos de los dominios constantes del anticuerpo significa la numeración de residuos por el sistema de numeración EU (*por ejemplo*, ver Solicitud de patente provisional estadounidense No. 60/640,323, describe la numeración de EU).

Un anticuerpo de "afinidad madura" es uno con una o más alteraciones en una o más de sus HVR que producen una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee estas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madura preferidos tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno blanco. Los anticuerpos de afinidad madura se producen usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por la transposición del dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la HVR y/o los residuos estructurales se describe en: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809–3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147–155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994–2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310–9 (1995); y Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889–896 (1992).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben en forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista" como se usa en la presente, es un anticuerpo que simula en forma total o parcial al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interést.

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo de IgE anti–humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene mayor afinidad de unión por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno proveniente de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de constante de afinidad (K_d) de no más de aproximadamente 1 x 10^{-7} M, con preferencia no más de aproximadamente 1 x 10^{-8} M y con máxima preferencia no más de aproximadamente 1 x 10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno proveniente de una segunda especie mamífera no

humana que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que se afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquier de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero con preferencia es un anticuerpo humanizado o humano.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza 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 de otro modo, como se usa en la presente, la "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno).La afinidad de una molécula X por su pareja Y en general se puede representar con una constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por métodos comunes en la técnica, que incluyen los que se describen en la presente. Anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen lentamente al antígeno y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen rápidamente al antígeno y tienden a permanecer unidos más tiempo. Una variedad de métodos de medir la afinidad de unión son conocidos en la técnica, alguno de cuales se pueden usar para los fines de la presente invención. Las formas de realización ilustrativas y especificas se describen a continuación.

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

730

En una forma de realización, la "Kd" o "valor e Kd" de acuerdo con esta invención se mide por un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) se realiza con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno se describe con el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de los Fab para el antígeno se mide al equilibrar el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, luego se captura el antígeno unido en una placa cubierta de anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas multipocillo (Dyner) se recubren toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (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), 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (*por ejemplo*, compatible con la evaluación del anticuerpo anti-FcRH5, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés posteriormente se incuba toda la noche, la incubación puede continuar durante un período más largo (*por ejemplo*, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (*por ejemplo*, durante una hora). Luego la solución se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con 0,1% de TWEEN-20™ en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma (Packard) durante diez minutos. Se seleccionan las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual a 20% de la unión máxima para usar en los ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra forma de realización, la Kd o el valor de Kd se mide por el uso de ensayos de resonancia del plasmón superficial usando un BIAcore™–2000 o a BIAcore™–3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)

a 25°C con chips de antígeno inmovilizado de CM5 a ~10 unidades de respuesta (RU). En breves palabras, los chips del biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan dos diluciones seriadas dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de tensioactivo TWEEN-20™ (PBST) a 25°C con una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de Langmuir simple uno a uno (BIAcore Evaluation Software versión 3,2) con ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, por ejemplo, Chen *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865–881. Si la tasa de asociación excede 10^6 M^{-1} s^{-1} por el ensayo de resonancia del plasmón superficial anterior, entonces la tasa de asociación se puede determinar por el uso de una técnica de inactivacion fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de 20 nM de anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta roja agitada.

Una "tasa de asociación" "velocidad de asociación," "tasa de asociación" o "k_{on}" de acuerdo con esta invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia del plasmón superficial que se describió anteriormente usando un BIAcore™–2000 o un

BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) como se describió anteriormente.

La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual" como se usa en la presente, indica un grado suficientemente alto de semejanza entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que los expertos en la técnica consideren que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (*por ejemplo*, valores de Kd). La diferencia entre dos de estos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 50%, menor de aproximadamente 40%, menor de aproximadamente 30%, menor de aproximadamente 20%, y con preferencia menos de aproximadamente 10% en función de un valor de referencia/comparador.

La frase "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en la presente, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora), de modo que los expertos en la técnica consideren que la diferencia entre los dos valores tiene significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (*por ejemplo*, valores de Kd, respuesta a HAMA). La diferencia entre dos de estos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10%, mayor de aproximadamente 20%, mayor de aproximadamente 30%, mayor de aproximadamente 40%, y con preferencia mayor de aproximadamente 50% en función de un valor de la molécula de referencia/comparadora.

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir un anticuerpo en forma selectiva. El antígeno blanco puede ser polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Con preferencia, el antígeno blanco es un polipéptido.

Una "estructura humana aceptora" para los fines de la presente es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de esta, o puede contener cambios de la secuencia de aminoácidos preexistente. Cuando los cambios de aminoácidos preexsitentes están presentes, con preferencia no nmás de 5 y con preferencia 4 o menos o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexsitentes están presentes. Cuando están presentes los cambios de aminoácidos preexistentes en una VH, con preferencia estos cambios se producen en solo tres, dos o una de las posiciones de 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos de las posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, la estructura humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la estructura de la secuencia de inmunoglobulina humana aceptora o secuencia de la estructura de consenso humana.

Una "estructura de consenso humana" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos naturales más comunes en una selección de secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana. En general, la selección las secuencias estructurales VL o VH de la inmunoglobulina humana es de un subgrupo de las secuencias del dominio variable. En general, el subgrupo de las secuencias es un subgrupo de Kabat *et al.*, *supra.* En una forma de realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I de Kabat *et al.*, *supra.* En una forma de realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III de Kabat *et al.*

Un "estructura de consenso de VH subgrupo III" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos de la región variable pesada del subgrupo III de Kabat *et al.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso VH del subgrupo III comprende al menos una porción o el total de cada una

de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 49)–H1–WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 50)–H2–RFTISRDNSKNTLILQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 51)–H3–WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52).

Una "estructura de consenso de VL del subgrupo I" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos de la región variable liviana kappa subgrupo I de Kabat *et al.* En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso VH del subgrupo I comprende al menos una porción o el total de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 45)–L1–WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 46)–L2–GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 47)–L3–FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 48).

Una "estructura humana no modificada" es una estructura humana que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la estructura humana aceptora, *por ejemplo* que carece de la sustitución de aminoácido humano a no humano en la estructura humana aceptora.

Una "región hipervariable alterada" para los fines de la presente es una región hipervariable que comprende una o más (*por ejemplo* uno a aproximadamente 16) sustitución de aminoácidos(s) en ella.

Una "región hipervariable no modificada" para los fines de la presente es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano de la que derivó, *es decir,* uno que carece de una o más sustituciones de aminoácido en ella.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo un blanco antigénico del polipéptido asociado al tumor, es uno que se une al antígeno con afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente terapéutico para dirigirse a una célula o tejido que exprese el antígeno, y no reacciona significativamente en forma cruzada con otras proteínas. En estas formas de realización, el grado de unión del anticuerpo a una proteína "no blanco" será de menos de

aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a su proteína blanco particular determinado por el análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula blanco, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epitope de un polipéptido particular significa la unión es apreciablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, por la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar por competición con una molécula control que es similar al blanco, por ejemplo, un exceso de blanco no marcado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del blanco marcado a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de blanco no marcado. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específica para" un polipéptido particular o un epitope en un blanco de polipéptido particular como se usa en la presente puede ser exhibida, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para el blanco de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o mayor. En una forma de realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en que una molécula que se une a un polipéptido particular o epitope de un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epitope de polipéptido.

Un anticuerpo que "inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido de FcRH5" o un anticuerpo "inhibidor del

crecimiento" es uno que produce una inhibición del crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido de FcRH5 apropiado. El polipéptido de FcRH5 puede ser un polipéptido de transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti–FcRH5 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan FcRH5 en más de 20%, con preferencia de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, y aun con más preferencia, en más de 50% (por ejemplo, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) en comparación con el control apropiado, el control normalmente es las células tumorales no tratadas con el anticuerpo analizado. En una forma de realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en un cultivo celular, cuando la inhibición del crecimiento se determina 1–10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de varios modos tal como se describe en la siguiente sección de Ejemplos experimentales. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti–FcRH5 a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción del tamaño tumoral o proliferación de las células tumorales dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, con preferencia dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce muerte celular programada determinada por la unión de anexina V, fragmentación del ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas membranosas (llamados cuerpos apoptóticos). La célula usualmente es una que sobreexpresa un polipéptido de FcRH5. Con preferencia la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula hematopoyética, tales como una

célula B, célula T, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, monocito, plaqueta o eritrocito. Varios métodos están disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfaidil serina (PS) se puede medir por la unión de anexina, la fragmentación de ADN se puede evaluar mediante la fragmentación en escalera del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN se puede evaluar por cualquier aumento de las células hipodiploides. Con preferencia, el anticuerpo que induce apoptosis es que uno que produce aproximadamente 2 a 50 veces, con preferencia aproximadamente 5 a 50 veces, y con máxima preferencia aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina con respecto a las células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

Un anticuerpo que "induce muerte celular" es uno que produce que una célula viable se convierte en inviable. La célula es una que expresa o sobreexpresa un polipéptido de FcRH5 y es de tipo de célula que expresa o sobreexpresa específicamente un polipéptido de FcRH5. La célula pueden ser células cancerosas o normales del tipo celular particular. El polipéptido de FcRH5 puede ser un polipéptido de transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido o secretado por una célula cancerosa. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B o célula T. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en la ausencia de complemento y células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad mediada por complemento (CDC). En consecuencia, el ensayo para muerte celular se puede realizar usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de membrana evaluada por la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripan (ver Moore et al. Cytotechnology 17:1–11 (1995)) o 7AAD respecto de las células no tratadas. Los anticuerpos inductores de

muerte celular preferidos son los que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en las células BT474.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad mediada por complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de células B); y activación de células B.

El término "región Fc" de la presente se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de la inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de la variante. Si bien los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podría variar, la región Fc de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana usualmente definida se extiende desde un residuo de aminoácido de la posición Cys226, o desde Pro230, a su extremo carboxilo terminal. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o por manipulación genética recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos pueden comprender poblaciones de anticuerpo con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin residuos K447.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de la secuencia nativa. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de células B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras

generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (*por ejemplo*, un dominio variable del anticuerpo) y se puede evaluar usando varios ensayos que se describen por ejemplo, en las definiciones de la presente.

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

Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la una región Fc de la secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, con preferencia una o más sustituciones de aminoácidos. Con preferencia, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de la secuencia nativa o a la región Fc de un polipéptido original, *por ejemplo*, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y con preferencia de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de la secuencia nativa o en la región Fc del presente polipéptido. La variante de la región Fc de la presente con preferencia poseerá al menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de la secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y con máxima preferencia al menos aproximadamente 90% de homología con ella, con más preferencia al menos aproximadamente 95% de homología con ella.

"Citoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida al receptor de las Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (*por ejemplo*, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente

a una célula blanco portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula blanco con las citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son necesarios para destruir de la célula blanco por este mecanismo. Las principales células para mediar la ADCC, las células NK expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se sintetiza en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457–92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en la patente estadounidense No. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). En forma alternativa o adicional, se puede evaluar la actividad de ADCC *in vivo*, *por ejemplo*, en un modelo animal tal como en que se describe en Clynes et al. (USA) 95:652–656 (1998).

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en la tirosina del inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en la tirosina del inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (ver revisión de M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203–234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457–492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25–34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330–41 (1995). Otros FcR, que incluyen los que identifiquen en el

futuro, estás comprendidos por el término "FcR" de la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la trasnferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

La unión al FcRn humano *in vivo* y la vida media sérica de los polipéptidos que se unen con alta afinidad al FcRn humano, *por ejemplo*, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humana, o en primates en los que se administran los polipéptidos con una variante de la región Fc. WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con aumento o disminución de la unión a las FcR. Ver también, *por ejemplo*, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Células efectoras humanas" son los leucocitos que expresan una o más FcR y realizan funciones efectoras. Con preferencia, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, se prefieren los PBMC y las células NK. . Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, *por ejemplo*, de sangre.

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia del complemento. La activación de la vía del complemento clásico se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) para los anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, *por ejemplo*, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Se describen variantes de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una variante de la región Fc) y aumento o disminución de la capacidad de unión de C1q, *por ejemplo*, en la patente estadounidense No. 6.194.551

B1 y WO 1999/51642. Ver también, *por ejemplo*, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El término "anticuerpo que comprende región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o por manipulación genética recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo el K447 eliminado o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido de FcRH5 se refiere a una forma del polipéptido de FcRH5 que está esencialmente libre de los dominios de transmembrana y citoplásmico. Comúnmente, un ECD del polipéptido de FcRH5 tendrá menos de 1% de dichos dominios de transmembrana y/o citoplásmico y con preferencia, tendrá menos de 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquiera de los dominios de transmembrana identificados por los polipéptidos de FcRH5 de la presente invención se identifica según los criterios empleados de rutina en la técnica para identificar el tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio de transmembrana pueden variar pero más probablemente no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada extremo del dominio inicialmente identificado en la presente. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido de FcRH5 puede contener de aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del límite del dominio de transmembrana/dominio extracelular identificado en los Ejemplos o memoria descriptiva y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y los ácidos nucleicos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

La ubicación aproximada de los "péptidos señal" del polipéptido de FcRH5 descripto en la presente se pueden mostrar en la presente memoria descriptiva y/o las figuras acompañantes. Se advierte, sin

embargo, que el límite C–terminal de un péptido señal puede variar, pero más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite C–terminal de un péptido señal identifcado inicialmente en la presente, en donde límite C–terminal del péptido señal se puede identificar según los criterios empleados de rutina en la técnica para identificar el tipo de elementos de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1–6 (1997) y von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683–4690 (1986)). Más aún, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, lo que produce más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, en que el péptido señal se escinde dentro de no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada lado del límite C–terminal del péptido señal identificado en la presente, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

"Variante del polipéptido de FcRH5" significa un polipéptido de FcRH5, con preferencia un polipéptido activo de FcRH5, como se define en la presente que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en la presente, una secuencia de polipéptidos de FcRH5 que carece del péptido señal como se describe en la presente, un dominio extracelular de un polipéptido de FcRH5, con o sin el péptido señal, como se describe en la presente o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de longitud completa como se describe en la presente (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa solo una porción de la secuencia codificadora completa para un polipéptido de FcRH5 de longitud completa). Dichas variantes del polipéptido de FcRH5 incluyen, por ejemplo, polipéptidos de FcRH5 en donde se añaden, o suprimen uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N- o C–terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Comúnmente, una variante del polipéptido de FcRH5 tendrá al menos

aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos, con una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en la presente, una secuencia de polipéptidos de FcRH5 que carece del péptido señal como se describe en la presente, un dominio extracelular de un polipéptido de FcRH5, con o sin el péptido señal, como se describe en la presente o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de longitud completa como se describe en la presente. Comúnmente, Los polipéptidos de la variante de FcRH5 son al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, Los polipéptidos de la variante de FcRH5 tendrán no más de una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa de los polipéptidos de FcRH5, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa de los polipéptidos de FcRH5.

Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos, es decir, secuencias de polipéptidos de FcRH5 identificadas en la presente se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos de la secuencia de péptidos o polipéptidos específicos, es decir, secuencias de polipéptidos de FcRH5, después de alinear las secuencias e introducir la brechas, si es necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna de las sustituciones conservadoras

como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede obtener de varias maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando un programa de computación disponible al público tal como el programa de computación BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen algunos algoritmos necesarios para obtener el alineamiento máximo respecto de la longitud completa de las secuencias comparadas. Para los fines de la presente, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN–2 se proporciona en la siguiente Tabla 1. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2 creado por Genentech, Inc., y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente ha sido presentado con la documentación del usuario en U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se registra bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente provisto en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 se podría compilar para usar en un sistema operativo UNIX, con preferencia UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen para el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción X/Y,

donde X es el número de residuos de aminoácidos clasificados como coincidencias exactas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 es este alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no equivaldrá al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

"Polinucleótido de la variante de FcRH5" o "secuencia de ácidos nucleicos de la variante de FcRH5" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FcRH5, con preferencia un polipéptido activo de FcRH5, como se define en la presente y que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en la presente, una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se describe en la presente, un dominio extracelular de un polipéptido de FcRH5, con o sin el péptido señal, como se describe en la presente o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de longitud completa como se describe en la presente (tales como los codificados por un ácido nucleico que representa solo una porción de la secuencia codificadora completa para un polipéptido de FcRH5 de longitud completa). Comúnmente, un polinucleótido de la variante de FcRH5 tendrá al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en la presente, una secuencia de polipéptidos

de FcRH5 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se describe en la presente, un dominio extracelular de un polipéptido de FcRH5, con o sin al secuencia señal, como se describe en la presente o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos de FcRH5 de longitud completa como se describe en la presente. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

Comúnmente, los polinucleótidos de la variante de FcRH5 son al menos aproximadamente de 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, o 1300 nucleótidos de longitud, en donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de la longitud de referencia.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a Secuencias de ácidos nucleicos que codifican FcRH5 identificadas en la presente se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos de la secuencias de ácidos nucleicos de FcRH5 de interés, después de alinear las secuencias e introducir la brechas, si es necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede obtener de varias maneras que están dentro de la

experiencia de la técnica, por ejemplo, usando un programa de computación disponible al público tal como el programa de computación BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los fines de la presente, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se generan usando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN–2 se proporciona en la siguiente Tabla 1. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2 creado por Genentech, Inc., y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente ha sido presentado con la documentación del usuario en U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se registra bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente provisto en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 se podría compilar para usar en un sistema operativo UNIX, con preferencia UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen para el programa ALIGN-2 y no varían

En situaciones donde se emplea ALIGN–2 para las comparaciones de la secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos dada C a, con o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos para, con o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción W/Z,

donde X es el número nucleótidos clasificados como coincidencias exactas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 es este alineamiento del programa de C y D, y donde Z es el número total de

residuos de nucleótidos de D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de D a C. A menos que indique específicamente de lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos usados en la presente se obtienen en como se describió en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa de computación ALIGN-2.

En otras formas de realización, los polinucleótidos de la variante de FcRH5 son moléculas de ácido nucleicos que codifican un polipéptido de FcRH5 y que son capaces de hibridación, con preferencia en condiciones de hibridación y lavado rigurosas, a las secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido de FcRH5 de longitud completa como se describe en la presente. Los polipéptidos de la variante de FcRH5 pueden ser los que están codificados por un polinucleótido de la variante de FcRH5.

El término "región codificadora de longitud completa" cuando se usa en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de FcRH5 se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de FcRH5 de longitud completa de la invención (que a menudo se muestra entre los codones de comienzo y detención, inclusive en estos, en las figuras acompañantes). El término "región codificadora de longitud completa" cuando se usa en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la porción del ADNc que codifica el polipéptido de FcRH5 que se inserta en el vector depositado con el ATCC (que a menudo se muestra entre los codones de comienzo y detención, inclusive en estos, en las figuras acompañantes (los codones de comienzo y detención están en negrita y subrayados en las figuras).

"Aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos de FcRH5 descriptos en la presente, significa el polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son

materiales que podrán interferir con investigación, diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En formas de realización preferidas, el anticuerpo se purificará (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna por el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa rotatoria, o (2) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o con preferencia tinción de plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido de FcRH5 no estará presente. Normalmente, sin embargo, se preparará el polipéptido aislado por al menos una etapa de purificación

Un polipéptido de ácido nucleico que codifica FcRH5 u otro ácido nucleico que codifica el polipéptido "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está comúnmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es diferente de la forma o configuración en la que se halla en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido aisladas en consecuencia se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido específica ya que está existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en las células que expresan comúnmente el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de las células naturales

La expresión "secuencias control" se refiere las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un

promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretora está unida operativamente al ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificadora si esta afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si esta se ubica de modo de facilitar la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN unidas están contiguas, y, en el caso de un líder secretora, en forma contigua y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no deben estar contiguos. La unión se obtiene por el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas superiores para el apareamiento apropiado, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para aparearse de nuevo cuando están presentes las cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. A mayor grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridable, mayor temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se deduce que las mayores temperaturas relativas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas inferiores lo harían menos. Para detalles adicionales

y la explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en la presente, se pueden identificar por las siguientes: (1) emplean fuerza iónica baja y alta temperatura para lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro de sodio/0,0015 M de citrato de sodio/0,1% de dodecilsulfato de sodio a 50° C; (2) emplea durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina sérica bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de buffer de fosfato de sodio a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42° C; o (3) hibridación toda la noche en una solución que emplea 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, con un lavado de 10 minutos a 42° C en 0,2 x de SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C seguido por un lavado de rigurosidad alta de 10 minutos que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55° C

Las "condiciones de rigurosidad moderada" se pueden identificarse en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las que se describieron anteriormente. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad moderada es incubación toda la noche la incubación a 37 °C en una solución que comprende: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5 x de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de de esperma e salmón fragmentado desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50 °C. Los profesionales expertos

reconocerán cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptar los factores tales como la longitud de la sonda y similares.

El término "epitope marcado" cuando se usa en la presente se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de FcRH5 o anticuerpo anti–FcRH5 fusionado a un "polipéptido con marca". El polipéptido con marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epitope contra el que se puede obtener un anticuerpo, incluso es suficientemente corto de modo de no interferir en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido con marca con preferencia también es relativamente único de modo que el anticuerpo sustancialmente no reacciona en forma cruzada con otros epitopes. Los polipéptidos con marca adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (con preferencia, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos.).

"Activo" o "actividad" para los fines de la presente se refieren a las formas de un polipéptido de FcRH5 que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de FcRH5 nativo o natural, en donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica (sea inhibidora o estimuladora) causada por FcRH5 nativo o natural que la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epitope antigénico poseído por un FcRH5 nativo o natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epitope antigénico poseído por un FcRH5 nativo o natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza en forma parcial o completa una actividad biológica de un polipéptido de FcRH5 nativo. De manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido de FcRH5 nativo. Las moléculas agonistas o antagonistas incluyen específicamente los anticuerpos o fragmento de anticuerpos

agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de FcRH5 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido de FcRH5, pueden comprender poner en contacto un polipéptido de FcRH5, con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable de una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido de FcRH5.

"Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos 95% en peso, o al menos 98% en peso de la muestra en que está contenida.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos otra molécula de ácido nucleico con la que está comúnmente asociada, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada además incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que comúnmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente en forma extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El término "vector," como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido" que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (*por ejemplo*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (*por ejemplo*, vectores de mamíferos no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma del huésped.

Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se unen en forma operativa. Dichos vectores se denominan en la presente como "vectores de expresión recombinante" o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, plásmido" y "vector" se pueden usar en forma indistinta el plásmido como la forma más comúnmente usada de vector.

"Polinucleótido," o "ácido nucleico," usados en forma indistinta en la presente, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero por acción de ADN o ARN polimerasa o por una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por los componentes no nucleótido. Un polinucleótido puede comprender modificaciones realizadas después de la síntesis, tal como la conjugación a una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, sustitución de "capuchones" de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, las que tienen uniones no cargadas (*por ejemplo*, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (*por ejemplo*, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen residuos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (*por ejemplo*, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (*por ejemplo*, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (*por ejemplo*, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen uniones modificadas (*por ejemplo*, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.),

así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares se puede reemplazar, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándares, o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o residuos de grupos capuchón orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar de grupos protectores estándares. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de ribosa o desoxirribosa que en general son conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleótidos básico tales como metil ribósido. Una o más uniones fosfodiéster se pueden reemplazar con grupos ligadores alternativos. Estos grupos ligadores alternativos incluyen pero sin limitación, formas de realización en donde el fosfato se reemplaza con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)O', CO, o CH_2 ("formacetal"), en el que cada R o R' es de modo independiente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que opcionalmente contiene una unión éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todas las uniones de un polinucleótido deben ser idénticas. La precedente descripción se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente, que incluyen ARN y ADN.

"Oligonucleótido" como se usa en la presente, en general se refiere a polinucleótidos cortos, en general monocatenarios, en general sintéticos que son en general, pero no necesariamente, menor de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para los polinucleótidos aplicable en forma equivalente y completa a los oligonucleótidos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición patológica fisiológica que normalmente se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o neoplasias linfoides, pero también a los cánceres del bazo y de los ganglios linfáticos y también carcinoma, blastoma y sarcoma. Los ejemplos de cáncer más particulares incluyen cánceres asociados a células B, que incluyen por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (que incluye linfomas de células B tales como, por ejemplo, linfomas de células B del tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, y linfoma de Hodgkin y linfoma de células T) y leucemias (que incluye leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica (CLL), tales como leucemia de células B (linfocitos CD5+ B), leucemia mieloide, tales como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL) y mielodisplasia), y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o células T. También se incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, que incluye leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y células citolíticas naturales. También se incluyen los trastorno proliferativo de las células B cancerosas seleccionados de los siguientes: linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocitico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto. Los orígenes de los cánceres de las células B incluyen los siguientes: orígenes de linfoma de células B de zona marginal en las células B de memoria en la zona marginal, el linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes se originan en la zona clara de los centros

germinales, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfocítica pequeña se origina en las células B1 (CD5+), el linfoma de células del manto se origina en las células B inactivas en la zona del manto y el linfoma de Burkitt se originan en los centroblastos de la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas denominadas en la presente como "tejidos de células hematopoyéticas" incluyen timo y médula ósea y tejidos linfoides periféricos, tales como bazo, ganglios linfáticos, tejidos linfoides asociados con mucosa, tales como tejidos linfoides asociados con intestino, amígdalas, parches de Peyer y apéndice y tejidos linfoides asociados con otra mucosa, por ejemplo, los revestimientos bronquiales. Otros ejemplos particulares de dichos cánceres incluye cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer pulmonar de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mamas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Una "neoplasia de células B" de la presente incluye linfoma no Hodgkin (NHL), que incluyen NHL folicular/grado bajo, NHL linfocítico pequeña (SL), NHL folicular/grado intermedio, NHL de grado intermedio difuso, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfobástica de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado, NHL masivo, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no Hodgkin (NHL), enfermedad de Hodgkin con predominio de leucocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica crónica (CLL), NHL indolente que incluye NHL indolente recidivante y NHL indolente refractario a rituximab, leucemia, que incluyen leucemia linfoblástica

aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblastica crónica; linfoma de células del manto; y otras neoplasias hematológicas. Dichas neoplasias se pueden tratar con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie de las células B, tales como FcRH5. Dichas enfermedades están contempladas en la presente para tratarse con la administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador de superficie de las células B, tal como FcRH5, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico que se describe en la presente. Dichas enfermedades también están contempladas en la presente para tratarse con terapia combinada que incluye un anticuerpo anti–FcRH5 o conjugado del anticuerpo anti–FcRH5 fármaco de la invención en combinación con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado en forma simultánea o en series. En el ejemplo método de tratamiento de la invención, se administra un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención en combinación con un anticuerpo anti-CD20, inmunoglobulina o fragmento de unión, ya sea en conjunto o secuencial. El anticuerpo anti-CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de anticuerpo y fármaco. En una forma de realización de la terapia combinada, el anticuerpo anti–FcRH5 es un anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti-CD20 es Rituxan® (rituximab).

El término "linfoma no Hodgkin" o "NHL", como se usa en la presente, se refiere a un cáncer del sistema linfático diferente de los linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin en general se pueden distinguir del linfoma no Hodgkin por la presencia de las células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin y la ausencia de dichas células en los linfomas no Hodgkin. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin comprendidos en el término como se usa en la presente incluyen cualquiera que se pueda ser identificado como tal por los expertos en la técnica (por ejemplo, un oncólogo o patólogo) de acuerdo con los esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tal como el esquema de linfoma americano-

europeo revisado (REAL) como se describe en Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edición), A. Victor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Ver, en particular, las listas de las Fig. 11,57, 11,58 y 11,59. Los ejemplos más específicos incluyen, pero sin limitación, NHL con recaída o refractario, NHL de bajo grado línea frontal, NHL estadio III/IV, NHL resistente a quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblásticos de precursor B, linfoma linfocítico pequeño, leucemia de células B linfocítica crónica y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítica de células B, inmunocitoma y/o leucemia linfoplasmacítica, linfoma linfoplasmacítica, linfoma de célula B de zona marginal, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma extranodal de zona marginal – MALT, linfoma nodal de zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma folicular de bajo grado, NHL folicular/ grado intermedio, linfoma de células del manto, linfoma del central folicular (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma difuso de células B grandes, NHL agresivo (que incluye NHL de línea frontal agresivo y NHLagresivo recidivante), NHL recidivante posteriores o refractario al trasplante antólogo de células madres, linfoma primario de células B grandes del mediastino, linfoma de efusión primaria, NHL inmunoblástica de alto grado, NHL linfoblástica de alto grado, NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado, NHL masiva, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular grande precursor (periférica), micosis fungoides y/o síndrome de Sezary, linfomas de piel (cutáneo), linfoma de células grandes anaplásicas, linfoma angiocéntrico.

Los trastornos de células plasmáticas resultan de la división o multiplicación descontrolada de un clon de células plasmáticas. Las células plasmáticas se originan de linfocitos B activados (es decir, células B). Cada célula B produce un receptor único, conocido como receptor de célula B, dispuesto en su superficie celular que es específica para una sustancia extraña, es decir, antígeno. Cuando un receptor de célula B se une a su antígeno cognado, la célula que expresa el receptor se activa para reingresar al ciclo celular, que produce muchas copias de sí misma.

Los clones maduran en las células plasmáticas que residen principalmente en la médula ósea y que se especializan en producir copias del receptor de la célula B que se liberan en la corriente sanguínea como anticuerpos. En un trastorno de las células plasmáticas, la célula plasmática o la célula B progenitora sufre daño genético que produce supresión o insensibilidad a las limitaciones normales sobre la división y/o actividad celular. Las células plasmáticas hijas derivadas de dichas células son malignas ya que ellas se pueden dividir sin restricciones y/o generar exceso de la misma inmunoglobulina (anticuerpo). A menudo la inmunoglobulina producida es incompleta o tiene una conformación incorrecta que puede producir la acumulación de la proteína (también denominada como proteína monoclonal, proteína M, paraproteína o proteína amiloide, dependiente del trastorno específico) en el suero, tejidos u órganos (en especial los riñones), lo que lleva a la disfunción y/o insuficiencia orgánica. Los trastornos de las células plasmáticas incluyen gamopatías monoclonales de significación indeterminada (MGUS), mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia, enfermedades de la cadena pesada, y amiloidosis de cadena liviana sistémica (AL), que se diferencian sobre al base de la naturaleza proliferativa del clon, el grado de compromiso medular y el tipo de proteína M expresada. Los trastornos de las células plasmáticas adicionales son plasmocitoma solitario, plasmocitoma extramedular, plasmocitomas solitarios múltiples, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfomas no Hodgkin, no células B, leucemia linfocítica crónica de células B. Si bien las nuevas inmunoterapias tales como rituximab y alemtuzumab han mejorado la supervivencia libre de enfermedad y global en algunas neoplasias de las células B, dichas terapias no han demostrado ser efectivas en el tratamiento de los trastornos de las células plasmáticas en parte debido a que los antígenos blanco, CD20 y CD52, respectivamente, no son expresados suficientemente por las células plasmáticas de clones malignos. En consecuencia, se necesita para la identificación y el desarrollo de la terapia mejorada de los trastornos de las células

plasmáticas. (ver Solicitudes publicada U.S. Nos. 20080166742 y 20080317745, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

La expresión de FcRH5 (IRTA2) sobre las células B, células plasmáticas y células del mieloma múltiple (que incluyen las células de las muestras de los pacientes MM) se ha mostrado previamente (ver Solicitud publicada U.S. No. 20060251662, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Por consiguiente, a la luz del patrón de expresión de FcRH5 en las muestras de mieloma múltiple, la molécula es un excelente objetivo para la terapia de tumores en mamíferos, que incluyen trastornos de las células plasmáticas, tales como los que se describen en la presente (es decir, mieloma múltiple) y enfermedades asociadas con la secreción de anticuerpos, tales como alergia o enfermedades autoinmunes.

Un "trastorno" es cualquier enfermedad que se beneficiaría por el tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Este incluye trastornos o enfermedades agudos o crónicos que incluyen estas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de los trastornos tratados en la presente incluyen condiciones cancerosas tales como tumores malignos y benignos; neoplasias no leucemias y linfoides; neuronal, glial, astrocital, hipotalámica y otras glándulas, trastornos de macrófagos, epitelial, estromal y blastocélico; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con angiogénesis. Los trastornos también incluye condiciones cancerosas tales como trastornos proliferatvos de células B y/o tumores de células B, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de

proliferación de células anormales. En una forma de realización, el trastorno de células proliferativas es cáncer.

"Tumor", como se usa en la presente, se refiere al total del crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Una "enfermedad autoinmune" en la presente memoria es una enfermedad o trastorno que surgen y dirigido contra tejidos u órganos propios del individuo o un co-segregado o manifestación del mismo o afección resultante del mismo. En muchos de estos trastornos autoinmunes e inflamatorios, varios marcadores clínicos y de laboratorio pueden existir, que incluyen, pero sin limitación a, hipergammaglobulinemia, altos niveles de autoanticuerpos, depósitos del complejo antígeno-anticuerpo de los tejidos, beneficios de los tratamientos de corticosteroides o inmunosupresores y agregados de células linfoideas en los tejidos afectados. Sin estar limitado por ninguna teoría respecto de la enfermedad autoinmune mediada por células B, se considera que las células B demuestran un efecto patogénico en las enfermedades autoinmunes a través de una multitud de vías mecanísticas, que incluyes la producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunes, activación dendrítica y activación de células T, síntesis de citoquina, liberación de quimioquina directa, y proporciona un nido para la neo-linfogénesis ectópica. Cada una de estas vías puede participar en diferentes grados de la patología de las enfermedades autoinmunes.

"Enfermedad autoinmune" puede ser una enfermedad específica del órgano (es decir, la respuesta inmune se dirige específicamente contra un sistema orgánico tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, la tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar múltiples sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), polimiositis, *etc.*). Las enfermedades preferidas incluyen trastornos

reumatológicas autoinmunes (tal como, por ejemplo, RA, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus tal como SLE y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, y artritis psoriática), trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (*por ejemplo*, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y enfermedad celíaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis negativa a ANCA y vasculitis asociada a ANCA, que incluye vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangiitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonus mioclonus, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tal como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, urticaria, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tal como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusión y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades de audición autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad de tiroides autoinmune (*por ejemplo*, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Las enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, RA, colitis ulcerativa, vasculitis asociada con ANCA, lupus, esclerosis múltiples, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis, y glomerulonefritis.

Los ejemplos específicos de otras enfermedades autoinmune definidas en la presente, que en algunos casos abarcan los enumerados antes, incluyen, pero sin limitación, artritis (aguda y crónica, artritis reumatoide que incluye artritis reumatoide de comienzo juvenil y etapas tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriática, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progresiva, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis por reducción de estrógenos y espondilitis anquilosante/espondilitis reumatoide), enfermedad linfoproliferativa autoinmune, enfermedades de la piel hiperproliferativa inflamatoria, psoriasis tales como psoriasis en placa , psoriasis guttata, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, atopia que incluye enfermedades atópicas tales como fiebre de heno y síndrome de Job, dermatitis que incluye dermatitis por contacto, dermatitis por contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, urticaria, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis por contacto irritante primaria y dermatitis atópica, síndrome de hiper-IgM ligada a x, enfermedades intraoculares alérgicas, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiomática crónica, que incluye urticaria autoinmune crónica, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma (que incluye escleroderma sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (MS) tal como MS espino-óptico, MS progresiva primaria (PPMS), y MS remitente-recidivante (RRMS), esclerosis progresiva sistémica, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinal mediadas autoinmmunes, colitis tales como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante

y colitis transmural y enfermedades intestinal inflamatoria autoinmune), inflamación del intestino, pioderma gangrenosa, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de distrés respiratorio, que incluye síndrome de distrés respiratorio adulto o agudo (ARDS), meningitis, inflamación de todas o parte de la uvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, enfermedad trasplante versus huésped, angioedema tal como angioedema hereditario, lesión nervioso craneano como en la meningitis, herpes gestationis, gestationis penfigoide, pruritos escrotal, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, pérdida de oído súbita debida a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinits alérgica y atópica, encefalitis tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbico y/o tronco del encéfalo, uveítis, tal como anterior uveítis, uveítis anterior agudas, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénico, uveítis posterior, o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis aguda o crónica tal como GN primaria, GN inmunomediada, GN membranosa (neuropatía membranosa), GN membranosa idiopática, GN proliferativa membrano o membranosa (MPGN), que incluye Tipo I y Tipo II, y GN rápidamente progresiva (RPGN), nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmune, balanitis que incluye balanitis circunscripta plasmocelular, balanopostitis, eritema anular centrifugo, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis laminar, hiperqueratosis epidermolítico, queratosis premaligna, pioderma gangrenosa, afecciones y respuestas alérgicas, alergias alimenticias, alergias a fármacos, alergias a insectos, trastornos alérgicos raros tales como mastocitosis, reacción alérgica, eczema que incluye eczema alérgico o atópico, eczema esteatótico, eczema dishidrótico y eczema palmoplantar vesicular, asma tal como asma bronquial, asma autoinmune, asma alérgico y asma pediátrico, afecciones que incluyen infiltración de las células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes

contra antígenos extraños tales como grupos sanguíneos A-B-O fetales durante la gestación, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus, que incluye lupus nefritis, lupus cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra-renal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus con alopecia, SLE, tal como SLE cutáneo o SLE cutáneo subaguda, síndrome de lupus neonatal (NLE), y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de comienzo juvenil (Tipo I), que incluye IDDM pediátrico, diabetes mellitus de comienzo adultos (diabetes Tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, neuropatía diabética, colitis diabética, trastorno diabético de grandes arterias, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad agua y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis linfomatosa, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitides, que incluye a vasculitis, vasculitis de grandes vasos (que incluye polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (Takayasu), vasculitis de vasos medianos (que incluye la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis hepersensible, vasculitis necrotizante tal como vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada con ANCA, tal como vasculitis de Churg-Strauss o síndrome (CSS) y vasculitis de pequeños vasos asociados con ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva a Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), enfermedad de Addison, anemia o aplasia de hematíes pura (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia(s) autoinmunes, citopenias tal como pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran diapédesis de leucocitos, enfermedades inflamatorias del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesión orgánica múltiple tal como los secundarios

a septicemia, trauma o hemorragia, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal anti-glomerular, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, motoneuritis, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide bulloso y penfigoide de la piel, pénfigos (que incluye pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo mucus-menmbranoso penfigoide y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica debida a una afección autoinmune, preeclampsia, un trastorno por complejo inmune tal como nefritis por complejo inmune, nefritis mediada por anticuerpo, trastornos neuro-inflamatorios, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatía IgM o neuropatías mediadas por IgM, trombocitopenia (como la que se desarrolla en pacientes como infarto de miocardio, por ejemplo), que incluye púrpura trombocitopenia trombótica (TTP), púrpura pos-transfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenia autoinmune o inmunomediada que incluye, por ejemplo púrpura trombocitopenia idiopática (ITP) que incluye ITP crónica o aguda, escleritis tal como queratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune de los testículos y ovario que incluye orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario, hipoparatirpodismo, enfermedades endocrinas autoinmune que incluyen tiroiditis tal como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes por ejemplo tipo I (o síndromes de endocrinopatías autoinmunes), síndromes paraneoplásicos, que incluyen síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome de Lambert-Eaton miasténico o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o síndrome de la rígida, encefalomielitis tal como encefalomielitis alérgica o encefalomielitis

alérgica y experimental (EAE), miastenia gravis tal como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclonus o síndrome opsoclonus mioclonus (OMS), y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan , hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis crónica activa o hepatitis crónica activa autoinmune, neumonitis tales como neumonitis intersticial linfoide (LIP), bronquiolitis obliterante (no-trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía IgA), neuropatía por IgA idiopática, dermatosis IgA lineal, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustular subcorneana, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y pneumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca o enfermedad de Coeliaca, sprue celíaco (enteropatía de gluten), sprue refractoria, sprue idiopático, crioglobulinemia tal como crioglobulinemia mixta, esclerosis lateral amilotrófica (ALS, enfermedad de Lou Gehrig'), enfermedad arteriocoronaria, enfermedad del oído autoinmune tal como enfermedad del oído interno autoinmune (AIED), pérdida de audición autoinmune, policondritis tal como policondritis refractaria o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado con zoster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de células B monoclonales (por ejemplo, gamopatía monoclonal benigna y gamopatía monoclonal de significación no determinada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmias, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomerulosclerosis focal o segmentaria o focal segmentaria (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, falla endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales

como enfermedades desmielinizantes autoinmunes y polineuropatías desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia totalis, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad masculina y femenina autoinmune, por ejemplo, debido a los anticuerpos anti-espermatozoides, enfermedades del tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome pos-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criadores de aves, angitis granulomatosa alérgica, angitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitos fiibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias tal como leishmaniasis, kipanosomiasis, esquistomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis intersticial del pulmón, mediastinitos fibrosante, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística , endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitos crónica, ciclitis heterocónica, iridociclitis (aguda o crónica), o ciclitos de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección de virus de inmunodeficiencia humana (HIV), SCID, síndrome de deficiencia adquirida inmune (SIDA), infección con echovirus, sepsis (síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección con parvovirus, infección con virus de rubella, síndromes pos-vacunación, infección estreptocócica, tromboangitis ubiterans, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, ción rubéola congénita, infección con virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, falla gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis polimialgia de células gigantes, neumonitis hipersensible crónica, conjuntivitis, tal como catarro primaveral, queratoconjuntivitis sicca, y queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, neuropatía de cambios mínimos, lesión por

reperfusión-isquemia benigna familial y repercusión del órgano trasplantado, autoinmunidad retiniana, inflamación de articulaciones, bronquitis, enfermedad de vías aérea/pulmonar obstructivo crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos (insuficiencia vascular cerebral) tal como encefalopatía arterioscleróticа y retinopatía, aspermiogenesia, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nudoso debido a lepra, parálisis idiomática, parálisis facial, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensoneural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regionalis, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, poliradiculitis agua, pioderma gangrenosa, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, timitis linfofolicular, vitiligo, síndrome de shock tóxico, intoxicación con alimentos, afecciones que incluyen infiltración de las células T, deficiencia de adhesión leucocitaria, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que involucran diapédesis de leucocitos, síndrome de falla multiorgánica, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmía simpatía, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo, síndrome nefrótico, insulitis, falla poliendocrina, síndromes poliglandulares autoinmunes, que incluye síndrome poliglandular tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de comienzo adulto (AOIH), cardiomiopatía tal como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoide, frontal, maxilar o esfenoide, sinusitis alérgica, un trastorno relacionado con eosinófilo tales

como eosinofilia, eosinofilia con infiltración pulmonar, síndrome eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, neumonía eosinofilia crónica, eosinofilia pulmonar tropical aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen eósinófilos, anafilaxis, espondiloartropatías, espondiloartritis seronegativa, enfermedad poliendocrina autoinmune, colangitis esclerosante, esclera, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de telangiectasia ataxia, angiectasia, trastornos autoinmunes asociados con enfermedad del colágeno, reumatismo tal como artrorreumatismo crónico, linfadenitis, reducción de la respuesta de la presión arterial, disfunción vascular, lesión del tejido, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión de repercusión trastornos de reperfusión isquémica del tejido miocárdico u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatoso, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, falla multiorgánica, enfermedades bullosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios ocular y orbital, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citoquina, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación intratable crónica, pielitis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis, y endometriosis. Dichas enfermedades están contempladas en la presente tratadas por la administración de un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de células B, tales como FcRH5, e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como se describe en la presente. Dichas enfermedades también están contempladas en la presente tratadas por la terapia de combinación que incluye un anticuerpo anti–FcRH5 o el conjugado del anticuerpo anti–FcRH5 y fármaco de la invención en combinación con otro

anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado en forma simultánea o en serie.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere al tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objetivo es prevenir o lentificar (reducir) la condición o trastorno patológico específico. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como los predispuestos a tener el trastorno o a aquellos en que se puede prevenir el trastorno. Un sujeto o mamífero "tratado" con éxito por un cáncer que expresa un polipéptido de FcRH5, si después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti–FcRH5 de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción de la cantidad de células cancerosas o ausencia de de células cancerosas; reducción del tamaño del tumor; inhibición (es decir, retardar en alguna medida y con preferencia detener) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos que incluye la propagación del cáncer en tejidos blandos y óseos; inhibición (es decir, retardar en alguna medida y con preferencia detener) de la metástasis tumoral; inhibición, retardar en alguna medida, o el crecimiento tumoral y/o alivio en alguna medida, de uno o más síntoma asociados con el cáncer especifico; reducción de la morbilidad y mortalidad y mejora de los temas de calidad de la vida. En la medida que el anticuerpo anti–FcRH5 pueda evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser notada por el paciente.

Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento exitoso y la mejora de la enfermedad se pueden medir fácilmente con procedimientos de rutina familiares para un médico. Para la terapia de cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, por la evaluación del tiempo a la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la tasa de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar por pruebas de clasificación en estadios y por exploraciones del hueso y pruebas para nivel de calcio y

otras enzimas para determinar la propagación al hueso. También se pueden realizar barridos de CT para buscar propagación a los ganglios de pelvis y linfáticos del área. Las radiografías de tórax y la medición de niveles de enzimas hepáticas por métodos conocidos se usan para buscar metástasis en los pulmones e hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para controlar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen evaluación citológica urinaria por cistoscopia, monitoreo de la presencia de sangre en orina, visualización del tracto urotelial por ecografía o un pielograma intravenoso, tomografía computada (CT) e imagen de resonancia magnética (MRI). La presencia de metástasis distantes se puede evaluar por CT del abdomen, rayos x de tórax o imágenes de radionucleidos del esqueleto.

Administración "crónica" se refiere a la administración del agente(s) en un modo continuo en contraste con un modo agudo, de modo de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo extendido. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

Un "individuo" es un vertebrado. En ciertas formas de realización, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja tales como vacas), animales de deporte, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y rata. En ciertas formas de realización, un mamífero es un ser humano.

Mamífero" para los fines del tratamiento, alivio de los síntomas de un cáncer se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye seres humanos, animales domésticos y animales de granja y animales de zoo, deportes o mascotas, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Con preferencia, el mamífero es un ser humano.

Administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

"Portadores" como se usan en la presente incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se exponen a estos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una solución amortiguadora de pH acuosa. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen buffer tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS®.

Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa en la que se puede adherir o unir un anticuerpo, oligopéptido de unión a FcRH5 o molécula orgánica de unión a FcRH5 de la presente invención. Los ejemplos de fase sólida abarcados en la presente incluyen las que se forman parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas formas de realización, de acuerdo con el contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las que se describen en la patente U.S. N.º 4.275.149.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como un anticuerpo de FcRH5) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

Una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" se define en la presente por tener un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Dalton,

Un "individuo" "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas formas de realización, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales de deporte, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas formas de realización, un mamífero es un ser humano.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se debe administrar la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todo microorganismo vivo y sus esporas.

Una "cantidad efectiva" de un anticuerpo como se describe en la presente es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad efectiva" se puede determinar en forma empírica y de manera rutinaria, en relación con el propósito establecido.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir,

retardar en alguna medida y con preferencia detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar en alguna medida y con preferencia detener) la metástasis tumoral; inhibir, en alguna medida, el crecimiento del tumor y/o aliviar en alguna medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. Ver la definición en la presente de "tratamiento". En la medida que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante períodos de tiempo necesarios para obtener el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva debe ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti–FcRH5 es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumor, por ejemplo, células cancerosas, *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti–FcRH5 para los fines de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar en forma empírica y de rutina.

Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti–FcRH5 es una cantidad capaz de causar la destrucción de de una célula, especialmente tumor, por ejemplo, células cancerosas, *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo a anti–FcRH5 para los fines de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar forma empírica y de rutina.

Una "célula que expresa FcRH5" es una célula que expresa un polipéptido endógeno o transfectado de FcRH5 tanto en la superficie celular como en forma secretada. Un "cáncer que expresa FcRH5" es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido de FcRH5 presente en la superficie celular o que produce y secreta un polipéptido de FcRH5. Un "cáncer que expresa FcRH5" opcionalmente produce niveles

suficientes de polipéptido de FcRH5 en la superficie de sus células, de modo que un anticuerpo anti-FcRH5 se puede unir a estos y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra forma de realización, un "cáncer que expresa FcRH5" opcionalmente produce niveles suficientes de polipéptido de FcRH5, de modo que un anticuerpo anti-FcRH5, oligopéptido u otra molécula orgánica antagonista pueda unirse a estos y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto a este último, el antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido que reduce, inhibe o evita la producción y secreción del polipéptido de FcRH5 secretado por las células tumorales. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido de FcRH5 es uno que tiene niveles significativamente superiores de polipéptido de FcRH5 en su superficie celular o lo produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede ser producida por la amplificación del gen o por aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión del polipéptido de FcRH5 se puede determinar en un ensayo de detección o pronóstico por la evaluación de los niveles aumentados de la proteína de FcRH5 presente en la superficie de una célula, o secretado por la célula (por ejemplo, por medio de un ensayo inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-FcRH5 preparados contra un polipéptido de FcRH5 aislado que se puede preparar usando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de FcRH5; análisis FACS etc.). En forma alternativa, o adicional, se puede medir los niveles de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FcRH5 o ARNm en la célula, por ejemplo, por medio de un hibridación *in situ* fluorescente usando una sonda basada en ácido nucleico que corresponde a un ácido nucleico que codifica FcRH5 o su complemento; (FISH; ver WO98/45479 publicado en octubre de 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa de tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido de FcRH5 por la medición de antígeno circulante en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo,

usando ensayos basados en anticuerpo (ver también, por ejemplo, patente U.S. N.º 4.933.294 presentada el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; patente U.S. 5.401.638 presentada el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, varios ensayos *in vivo* están disponibles para el profesional experto. Por ejemplo, se puede exponer las células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células del paciente, por ejemplo, por barrido externo para determinar radiactividad o por el análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Como se usa en la presente, el término "imunoadhesina" denomina moléculas tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Desde el punto de vista estructural, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la del reconocimiento del antígeno y del sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina de la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos de IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (que incluyen IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

La palabra "marca" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de modo de generar un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcada". La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo

marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

El término "agente citotóxico" como se usa en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se considera que el término incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de estos, y varios agentes antitumorales o anticáncer que se describen a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa destrucción de células tumorales.

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

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil para el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamine, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietiientiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (que incluye los análogos sintéticos de topotecano); briostatina; calistatina; CC–1065 (que incluye sus análogos

sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y crtptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW–2189 y CB1–TM1); eleuterobin; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, en especial calicheamicina gamma1I, calicheamicina omegal1 (ver, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183–186 (1994)); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y antibióticos cromóforos de enediina relacionados con la cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6–diazo–5–oxo–L–norleucina, ADRIAMYCIN® doxorrubicina (que incluye morfolino–doxorrubicina, cyanomorfolino–doxorrubicina, 2–pirrolino–doxorrubicina y deoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, mycophenolic acid, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, , testolactono; anti-adrenales tales como

aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona elfornitina acetato de eliptinio; un epotilón; etóglucido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maytansinoides tales como maytansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, O); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina, mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol–Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ libre de Cremophor, formulaciones de nanopartículas manipuladas genéticamente en albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône– Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6–tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP–16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (Camptosar, CPT–11)(que incluye el régimen de tratamiento de irinotecano con 5–FU y leucovorina); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; VELCADE; Revlimid® (lenalidomida); leucovorina (LV); oxaliplatino, que incluye el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC–alfa, Raf, H–Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y FcRH5–A que reducen la proliferación celular y y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno o (que incluye NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4–hydroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON· torremifeno; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo 4(5)–imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato de megestrol, AROMASIN® exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol; y anti–andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes de las vías se señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC–alfa, Raf y H–Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de FcRH5 (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapias génicas, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL–2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (ver patente U.S. No. 4.675.187), y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

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

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosas que expresa FcRH5, sea *in vitro* o *in vivo*. En consecuencia, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de las células que expresan FcRH5 de la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos ye inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Información adicional se puede hallar en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Chapter 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer derivados del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de los microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al impedir la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis de las células.

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

El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan con otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citoquinas son

linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen dentro de las citoquinas las hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionilada, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona folículoestimulante (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y -β; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-β; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGFs) tales como TGF-α y TGF-β; factor de crecimiento tipo insulina I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α, β, y γ; factores estimulantes de colonia (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL- 1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-α o TNF-ß; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y kit del ligando (KL). Como se usa en la presente, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o precauciones respecto del uso de dichos productos terapéuticos.

El término "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto que proviene de un proceso o reacción metabólica dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). El proceso o reacción

metabólica puede ser un proceso enzimático, tal como la escisión proteolítica de un péptido ligador de ADC, o hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster, o amida. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fármaco libre que han experimentado la escisión intracelular después de la entrada, difusión, absorción o transporte en una célula.

Los términos "escindido en forma intracelular" y "escisión intracelular" se refiere a un proceso o reacción metabólica dentro de una célula en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde la unión covalente, es decir, el ligador, entre el residuo del fármaco (D) y el anticuerpo (Ab) está rota, lo que produce que el fármaco se disocie del anticuerpo dentro de la célula. Los residuos escindidos de la ADC en consecuencia son metabolitos intracelulares.

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles de sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición del tiempo (tasa) y la cantidad total (grado) de fármaco que alcanza la circulación general de una forma de dosis administrada.

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

El término "alquilo" como se usa en la presente se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada saturada de uno a doce átomos de carbono (C_1–C_{12}), en donde el radical alquilo opcionalmente puede estar sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes que se describen a continuación. En otra forma de realización, un radical alquilo tiene uno a ocho átomos de carbono (C_1–C_8), o uno a seis átomos de carbono (C_1–C_6). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$),

1–propilo (n–Pr, n–propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2–propilo (i–Pr, i–propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1–butilo (n–Bu, n–butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–metil–1–propilo (i–Bu, i–butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2–butilo (s–Bu, s–butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2–metil–2–propilo (t–Bu, t–butilo, $-C(CH_3)_3$), 1–pentilo (n–pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3–pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–2–butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3–metil–1–butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2–metil–1–butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1–hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3–hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2–metil–2–pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4–metil–2–pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3–metil–3–pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–3–pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3–dimetil–2–butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3–dimetil–2–butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$, 1–heptilo, 1–octilo, y similares.

El término "alquenilo" se refiere a radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2–C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble carbono–carbono, sp^2, en donde el radical alquenilo puede estar opcionalmente sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes descriptos en la presente, e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etilenilo o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$), y similares.

El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o ramificado de dos a ocho átomos de carbono (C_2–C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple carbono–carbono, sp, en donde el radical alquinilo puede estar opcionalmente sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes descriptos en la presente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargilo, $-CH_2C\equiv CH$), y similares.

El términos "carbociclo", "carbociclilo", "anilo carbocíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un anillo monovalente no aromático, saturado o parcialmente insaturado que tiene 3 a 12 átomos de carbono (C_3–C_{12}) como anillo monocíclico o 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos anulares se pueden disponer como sistema de biciclo [5,6] o [6,6] o como sistemas de puente tales como biciclo[2,2,1]heptano, biciclo[2,2,2]octano y biciclo[3,2,2]nonano. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1–ciclopent–1–enilo, 1–ciclopent–2–enilo, 1–ciclopent–3–enilo, ciclohexilo, 1–ciclohex–1–enilo, 1–ciclohex–2–enilo, 1–ciclohex–3–enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo, y similares.

"Arilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6–20 átomos de carbono (C_6–C_{20}) derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono único de un sistema anula aromático original. Algunos grupos arilo están representados en los ejemplos de estructuras como "Ar". Arilo incluye los radicales bicíclicos que comprenden anillo aromático fusionado a un anillo carbocíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno (fenilo), benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2–dihidronaftaleno, 1,2,3,4–tetrahidronaftilo, y similares. Los grupos arilo están opcionalmente sustituidos de modo independiente con uno o más sustituyentes descriptos en la presente.

El términos "heterociclo" "heterciclilo" y "anillo heterocíclico" se usan en forma indistinta en la presente y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a 20 átomos anulares en que al menos un átomo anular es un heteroátomo

seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, los restantes átomos anulares son C, donde uno o más átomos anulares está opcionalmente sustituido de modo independiente con uno o más sustituyentes que se describen a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 al presente), en particular Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales donde los radicales heterociclo están fusionados con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o carbocíclico aromático o anillo heterocíclico. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidinilo, oxetanilo, thietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, thiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2–pirrolinilo, 3–pirrolinilo, indolinilo, 2H–piranilo, 4H–piranilo, dioxanilo, 1,3–dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3–azabicico[3,1,0]hexanilo, 3–azabiciclo[4,1,0]heptanilo, azabiciclo[2,2,2]hexanilo, 3H–indolilquinolizinil y N–piridil ureas. Los restos espiro también se incluyen dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de un grupo heterocíclico en donde 2 átomos de carbono del anillo están sustituidos con restos oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1–dioxo–tiomorfolinilo. Los grupos heterociclo de la presente están opcionalmente sustituidos de modo independiente con uno o más sustituyentes descriptos en la presente.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de 5–, 6–, o 7 miembros de anillo e incluye sistemas anulares fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5–20 átomos, que contienen uno o más heteroátomos seleccionados de modo independiente de nitrógeno, oxígeno, y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (que incluye, por ejemplo, 2–hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (que incluye, por ejemplo, 4–hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolicinilo, ftalacinilo, piridacinilo, triacinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftyridinilo, y furopiridinil. Los grupos heteroarilo están opcionalmente sustituidos de modo independiente con uno o más sustituyentes descriptos en la presente.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos a carbono (ligados a carbono), o nitrógeno (ligado a nitrógeno) cuando esto es posible. A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos a carbono en la posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3, o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo y sin limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2–pirrolina, 3–pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2–imidazolina, 3–imidazolina, pirazol, pirazolina, 2–pirazolina, 3–pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H–indazol, posición 2 de un

isoindol, o isoindolina, posición 4 de una morfolina y posición 9 de un carbazol, o β–carboline.

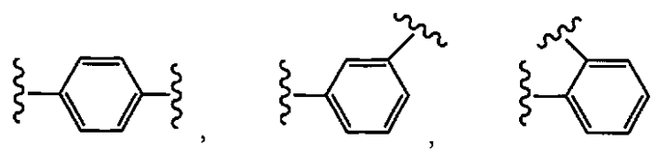
"Alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado de cadena ramificada o lineal o cíclica de 1–18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano original. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero sin limitación: metileno (–CH_2–) 1,2–etilo (–CH_2CH_2–), 1,3–propilo (–$CH_2CH_2CH_2$–), 1,4–butilo (–$CH_2CH_2CH_2CH_2$–), y similares.

Un "alquileno C_1–C_{10}" es un grupo hidrocarbonado saturado de cadena lineal de la fórmula –$(CH_2)_{1-10}$–. Los ejemplos de un alquileno C_1–C_{10} incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, ocitileno, nonileno y decaleno.

"Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado, de cadena ramificada o lineal o cíclica de 2–18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno original. Los radicales de alquenileno típicos incluyen, pero sin limitación: 1,2–etileno (–CH=CH–).

"Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico de 2–18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alquino original. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero sin limitación: acetileno (–C≡C–), propargilo (–CH_2C≡C–), y 4–pentinilo (–$CH_2CH_2CH_2$C≡C–).

Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y pueden estar en orto, meta, o para configuraciones que se muestran en las siguientes estructuras:



en que el grupo fenilo pueden estar no sustituidos o sustituidos con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación, alquilo $-C_1-C_8$, –O–(alquilo C_1-C_8), –arilo, –C(O)R', –OC(O)R', –C(O)O', $-C(O)NH_2$, –C(O)NHR', $-C(O)N(R')_2$ $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, –S(O)R', –OH, –halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, –NH(R'), $-N(R')_2$ y –CN; en donde cada R' se selecciona de modo independiente de H, alquilo $-C_1-C_8$ y arilo.

"Arilalquilo" se refiere un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3, está reemplazado con un radical arilo. Los grupos arilalquilo incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2–feniletan–1–ilo, 2–fenileten–1–ilo, naftilmetilo, 2–naftiletan–1–ilo, 2–naftileten–1–ilo, naftobencilo, 2–naftofeniletan–1–ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el resto alquilo, que incluye los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo es 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo es 5 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 se remplaza con un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero sin limitación, 2–bencimidazolilmetilo, 2–furiletilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo es 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo es 5 a 14 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación

con el fármaco original y es capaz de activar enzimáticamente o convertir en la forma original más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transacions*, 14, pp. 375–382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247–267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos que contienen D aminoácidos modificados, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β–lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5–fluorocitosina y otros profármacos de 5–fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos se pueden derivar en una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por "terapia de radiación" se entiende el uso de los rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir suficiente daño a un célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o destruir la célula totalmente. Se apreciará que existirán muchas maneras de conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típcios se dan en forma de administración de una vez por día y las dosis típicas varían de 10 a 200 unidades (Gray) por día.

Un "metabolito" es un producto generado mediante el metabolismo en el cuerpo de un compuesto especificado o una sal de este. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas de rutina conocidas en la materia y sus actividades determinadas usando pruebas tales como las descriptas en la presente. Dichos productos pueden provenir por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la

invención incluye los metabolitos de los compuestos de la invención, que incluyen compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de esta invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para producir un producto metabólico de este.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es de utilidad para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

"Ligador" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une en forma covalente un anticuerpo a un residuo de fármaco. En varias formas de realización, los ligadores incluyen un radical divalente tales como un alquildiílo, an arildiílo, a heteroarildiílo, restos tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetidas de alquiloxi (por ejemplo polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo polietilenamino, Jeffamine™); y éster deiácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

El término "quiral" se refiere a las moléculas que tienen la propiedad de no superponerse al compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se pueden superponer en su compañero de imagen especular.

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

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

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

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente generalmente siguen S. P. Parker, Ed., *McGraw–Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw–Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada. Para describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o *R* y *S*, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula acerca de su centro quiral. Los prefijos d y l o (+) y (–) se emplean para designar el signo de rotación del plano de la luz polarizada por el compuesto con (–) o l que significa que el compuesto es levogiratorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrogiratorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto que estos son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar como un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros a menudo se llama una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como una mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereospecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles por medio de una barrera de energía baja. Por ejemplo, los tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen las interconversiones por medio de la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto–enol e imina–enamina. Los tautómeros de valencia incluyen las interconversiones por la reorganización de algunos de los electrones de enlace.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención. Los ejemplos de sales incluyen, pero sin limitación sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metansulfonato "mesilato", etansulfonato, bencensulfonato, *p*–toluensulfonato, y pamoato (es decir, 1,1'–metilen–bis(2–hidroxi–3–naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede involucrar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser un resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener contrapones múltiples. En consecuencia, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metansulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido masónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido piranosidílico tales como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfahidroxi ácido tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido

sulfónico tal como ácido p–toluensulfónico o ácido etansulfónico o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas tales como piperidina, morfolina y piperacina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición deber compatible desde el punto de vista químico y/o toxicológico con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero tratado con ellas.

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

El término "grupo protector" se refiere a un sustituyentes que se emplea comúnmente para bloquear o proteger un grupo funcional particular mientras que reaccionan otros grupos funcionales del compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege el grupo funcional amino del compuesto. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t–butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9–fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). De modo similar, un "grupo protector de hidroxi" se refiere a un sustituyente de un grupo hidroxi que

bloquea o protege el grupo funcional hidroxi. Los grupos protectores adecuados incluyen acetilo y sililo. Un "grupo protector de carboxi" se refiere a un sustituyente del grupo carboxi que bloquea o protege el grupo funcional carboxi. Los grupos protectores de carboxi comunes incluyen fenilsulfoniletilo, cianoetilo, 2–(trimetilsilil)etilo, 2–(trimetilsilil)etoximetilo, 2–(p–toluensulfonil)etilo, 2–(p–nitrofenilsulfenil)etilo, 2–(difenilfosfino)–etilo, nitroetilo y similares. Para una descripción general de grupos protectores y sus uso, ver T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

"Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que se puede sustituir con otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (*por ejemplo*, cloruro, bromuro, yoduro), metanesulfonilo (mesilo), p–toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

COMPONENTES DEL LIGADOR:

MC = 6–maleimidocaproílo

Val–Cit o "vc" = valina–citrulina (un ejemplo de dipéptido en un ligador escindible con proteasa)

Citrulina = ácido 2–amino–5–ureido pentanoico

PAB = p–aminobenciloxicarbonilo (un ejemplo de un componente ligador "auto inmolado")

Me–Val–Cit = N–metil–valina–citrulina (en donde el enlace del péptido ligador ha sido modificado para evitar su escisión por catepsina B)

MC(PEG)6–OH = maleimidocaproil– polietilenglicol (puede ser unido a las cisteínas del anticuerpo).

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono–metil auristatina E (MW 718)

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

MMAF–DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminetilamina) en una unión amida al C–terminal de fenilalanina (MW 801,5)

MMAF–TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado a la fenilalanina

MMAF–NtBu = N–t–butilo, unido como amida al extremo C–terminal de MMAF

DM1 = N(2')–desacetil–N(2')–(3–mercapto–1–oxopropil)–maytansina

DM3 =N(2')–desacetil–N2–(4–mercapto–1–oxopentil)–maytansina

DM4 = N(2')–desacetil–N2–(4–mercapto–4–metil–1–oxopentil)–maytansina

Otras abreviaturas son las siguientes: AE es auristatina E, Boc es *N*–(*t*–butoxicarbonil), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCC es 1,3–diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*–diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4–dimetilaminopiridina, DME es etileneglicol dimetil éter (o 1,2–dimetoxietano), DMF es *N,N*–dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, ov es *N,N*–dimetilvalina, DTNB es 5,5'–ditiobes(ácido 2–nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilenetriaminopentaacético, DTT es ditiotreitol, EDCI es clorhidrato de 1–d3–dimetilaminopropil)–3–etilcarbodiimida, EEDQ es 2–etoxi–1–etoxicarbonil–1,2–dihidroquinolina, ES–MS es espectrometría de masa por electroaspersión, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*–(9–fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato *O*–(7–azabenzotriazol–1–il)–*N,N,N',N'*–tetrametiluronio, HOBt es 1–hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH_3CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4–anesildifenilmetilo (o 4–metoxitritilo), nor es (*1S, 2R*)–(+)–norefedrina, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p–nitrofenilo, MC es 6–maleimidocaproilo, phe es L–fenilalanina,

200

PyBrop es hexafluorofosfato bromo 3–pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía en capa delgada, UV es ultravioleta, y val es valina.

Un "aminoácido de cisteína libre" se refiere a un residuo de aminoácido de cisteína que ha sido manipulado genéticamente en un anticuerpo original, tiene un grupo funcional tiol (–SH), y no está apareado como un puente disulfuro intramolecular o intermolecular.

El término "valor de reactividad de tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de los aminoácidos de cisteína libres. El valor de reactividad de tiol es el porcentaje de un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que reacciona con un agente reactivo con tiol, y se convierte a un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido de cisteína libre en un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que reacciona con 100% de rendimiento con un agente reactivo con tiol, tal como un reactivo de biotina–maleimida, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad de tiol de 1,0. Otro aminoácido de cisteína manipulado genéticamente en el mismo o diferente anticuerpo original que reacciona con 80% de rendimiento con un agente reactivo con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0,8. Otro aminoácido de cisteína manipulado genéticamente en el mismo o diferente anticuerpo original que falla totalmente en reaccionar con un agente reactivo con tiol tiene un valor de reactividad de tiol de 0. La determinación del valor de reactividad de tiol de una cisteína particular se puede realizar por ensayo ELISA, espectrometría de masa, cromatografía líquida, autorradiografía u otros ensayos analíticos cuantitativos.

Un "anticuerpo original" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la que uno o más residuos de aminoácidos están reemplazados por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo original puede comprender una secuencia nativa o tipo salvaje. El anticuerpo original puede tener modificaciones de la secuencia de

aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, supresiones y/o sustituciones) respecto de otras formas nativas, tipo salvaje, o modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo original se puede dirigir contra un antígeno blanco de interés, por ejemplo un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipéptidos (tales como antígenos de glicolípidos asociados al tumor; ver US 5091178).

Tabla 1

```
/*
 *
 * C–C aumentado de 12 a 15
 * Z es promedio de EQ
 * B es promedio de ND
 * coincide con detención es _M; detención–detención = 0; J (joker) coincidencia = 0
 */
#definir      _M    –8     /* valor de una coincidencia con una detención */

int     _día[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0,–2, 0, 0,–4, 1,–1,–1, 0,–1,–2,–1, 0,_M, 1, 0,–2, 1, 1, 0, 0,–6, 0,–3, 0},
/* B */  { 0, 3,–4, 3, 2,–5, 0, 1,–2, 0, 0,–3,–2, 2,_M,–1, 1, 0, 0, 0, 0,–2,–5, 0,–3, 1},
/* C */  {–2,–4,15,–5,–5,–4,–3,–3,–2,  0,–5,–6,–5,–4,_M,–3,–5,–4,  0,–2, 0,–2,–8, 0, 0,–5},
/* D */  { 0, 3,–5, 4, 3,–6, 1, 1,–2, 0, 0,–4,–3, 2,_M,–1, 2,–1, 0, 0, 0,–2,–7, 0,–4, 2},
/* E */  { 0, 2,–5, 3, 4,–5, 0, 1,–2, 0, 0,–3,–2, 1,_M,–1, 2,–1, 0, 0, 0,–2,–7, 0,–4, 3},
/* F */  {–4,–5,–4,–6,–5, 9,–5,–2, 1, 0,–5, 2, 0,–4,_M,–5,–5,–4,–3,–3, 0,–1, 0, 0, 7,–5},
/* G */  { 1, 0,–3, 1, 0,–5, 5,–2,–3, 0,–2,–4,–3, 0,_M,–1,–1,–3, 1, 0, 0,–1,–7, 0,–5, 0},
/* H */  {–1, 1,–3, 1, 1,–2,–2, 6,–2, 0, 0,–2,–2, 2,_M, 0, 3, 2,–1,–1, 0,–2,–3, 0, 0, 2},
/* I */  {–1,–2,–2,–2,–2, 1,–3,–2, 5, 0,–2, 2, 2,–2,_M,–2,–2,–2,–1, 0, 0, 4,–5, 0,–1,–2},
```

```
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0},
/* K */  {–1, 0,–5, 0, 0,–5,–2, 0,–2, 0, 5,–3, 0, 1,_M,–1, 1, 3, 0, 0, 0,–2,–3,
0,–4, 0},
/* L */  {–2,–3,–6,–4,–3, 2,–4,–2, 2, 0,–3, 6, 4,–3,_M,–3,–2,–3,–3,–1, 0,
2,–2, 0,–1,–2},
/* M */  {–1,–2,–5,–3,–2, 0,–3,–2, 2, 0, 0, 4, 6,–2,_M,–2,–1, 0,–2,–1, 0, 2,–
4, 0,–2,–1},
/* N */  { 0, 2,–4, 2, 1,–4, 0, 2,–2, 0, 1,–3,–2, 2,_M,–1, 1, 0, 1, 0, 0,–2,–4,
0,–2, 1},
/* O */  {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */  { 1,–1,–3,–1,–1,–5,–1, 0,–2, 0,–1,–3,–2,–1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,–1,–
6, 0,–5, 0},
/* Q */  { 0, 1,–5, 2, 2,–5,–1, 3,–2, 0, 1,–2,–1, 1,_M, 0, 4, 1,–1,–1, 0,–2,–5,
0,–4, 3},
/* R */  {–2, 0,–4,–1,–1,–4,–3, 2,–2, 0, 3,–3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,–1, 0,–2, 2,
0,–4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0,–3, 1,–1,–1, 0, 0,–3,–2, 1,_M, 1,–1, 0, 2, 1, 0,–1,–2,
0,–3, 0},
/* T */  { 1, 0,–2, 0, 0,–3, 0,–1, 0, 0, 0,–1,–1, 0,_M, 0,–1,–1, 1, 3, 0, 0,–5,
0,–3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0},
/* V */  { 0,–2,–2,–2,–2,–1,–1,–2, 4, 0,–2, 2, 2,–2,_M,–1,–2,–2,–1, 0, 0,
4,–6, 0,–2,–2},
/* W */  {–6,–5,–8,–7,–7, 0,–7,–3,–5, 0,–3,–2,–4,–4,_M,–6,–5, 2,–2,–5, 0,–
6,17, 0, 0,–6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0},
/* Y */  {–3,–3, 0,–4,–4, 7,–5, 0,–1, 0,–4,–1,–2,–2,_M,–5,–4,–4,–3,–3, 0,–
2, 0, 0,10,–4},
```

```
/* Z */   { 0, 1,–5, 2, 3,–5, 0, 2,–2, 0, 0,–2,–1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,–2,–6,
0,–4, 4}
};
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 */
#incluye <stdio.h>
#incluye <ctype.h>

#define     MAXJMP    16    /* saltos máximos en una diag */
#define     MAXGAP    24    /* no continuar para penalizar brechas
más grandes que esta */
#define     JMPS      1024  /* saltos máximos en una vía */
#define     MX        4     /* guardar si hay al menos MX–1 bases
desde el último jmp */

#define     DMAT      3     /* valor de coincidencia de bases */
#define     DMIS      0     /* penalización por no coincidencia de
bases */
#define     DINS0     8     /* penalización para una brecha */
#define     DINS1     1     /* penalización por base */
#define     PINS0     8     /* penalización para una brecha */
#define     PINS1     4     /* penalización por residuo */

estruct jmp {
        corto           n[MAXJMP]; /* tamaño del jmp (neg para el dely) */
        corto sin signo     x[MAXJMP]; /* base no. de jmp en seq x */
};                                  /* límites seq a 2^16 –1 */

estruct diag {
        int             puntuación;         /* puntuación del último jmp */
        larga  ajuste;      /* ajuste del bloque previo */
        corto           ijmp;           /* índice de jmp actual */
        estruct jmp     jp;             /* lista de jmps */
};
```

```
estruct de vía{
        int     spc;            /* número de espacios principales */
        corto   n[JMPS];        /* tamaño de jmp (gap) */
        int     x[JMPS];        /* loc de jmp (último elemento antes de la
brecha) */
};

char            *ofile;                 /* nombre de archivo de salida*/
char            *namex[2];              /* nombres de seq: getseqs() */
char            *prog;                  /* nombre de programa para error
msgs */
char            *seqx[2];                       /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* mejor diag: nw() */
int             dmax0;                          /* diag final */
int             dna;                    /* ajustar si dna: principal() */
int             endgaps;                        /* ajustar si se penaliza brechas
finales*/
int             gapx, gapy;             /* brechas totales en seq */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;                   /* tamaño total de brechas */
int             smax;                   /* puntuación máx: nw() */
int             *xbm;                   /* mapa de bit para coincidencia */
largo   ajuste;                 /* ajuste actual en archivo jmp */
estruct         diag    *dx;                    /* mantiene diagonales */
estruct         path    pp[2];          /* mantiene vía durante seqs */

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

Tabla 1 (cont')

```
/* Programa de alineamiento de Needleman–Wunsch
 *
 * uso: programas archivo1 archivo2
 * donde archivo1 y archivo2 son dos secuencias de dna o dos secuencias de proteínas.
 *  Las secuencias pueden estar en mayúscula o minúscula y pueden contener ambigüedad
 *  Algunas líneas que comienzan con ';', '>' o '<' son ignoradas
 *  La longitud máxima del archivo es 65535 (limitado por corto x sin signo en la estructura de jmp)
 * Una secuencia con 1/3 o más de sus elementos ACGTU se asume que es ADN
 * El resultado está en el archivo "align.out"
 *
 * El programa puede crear un archivo tmp en/tmp para manetener la información acerca de la trazabilidad.
 * Versión original desarrollada bajo BSD 4,3 en vax 8650
 */
#incluye "nw.h"
#incluye "día.h"

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

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

```
main(ac, av)                                                    main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"uso: %s archivo1 archivo2\n", prog);
                fprintf(stderr," archivo1 y archivo2 son dos secuencias de
dna o dos secuencias de proteínas.\n");
                fprintf(stderr," secuencias pueden estar en mayúscula o
minúscula\n");
                fprintf(stderr,"Algunas líneas que comienzan con ';' o '<' se
ignoran\n");
                fprintf(stderr,"El resultado está en el archivo \"align.out\"\n");
                salida(1);
        }
        nombrex[0] = av[1];
        nombrex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(nombrex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(nombrex[1], &len1);
        xbm = (dna)? dbval : pbval;

        endgaps = 0;            /* 1 para penalizar endgaps */
        ofile = "align.out";            /* archivo de resultado */

        nw();           /* cargar en la matriz, obtener posibles jmps */
        readjmps();     /* obtener los actual reales */
        print();        /* estadística de impresión, alineamiento */

        cleanup(0);     /* eliminar archivos tmp */}
```

Tabla 1 (cont')

```
/* realizar el alineamiento, volver a la mejor puntuación: principal()
 * dna: valores en Fitch y Smith, PNAS, 80, 1382–1386, 1983
 * pro: valores PAM 250
 * Cuando las puntuaciones son iguales, se prefiere ninguna coincidencia
en ninguna brecha, preferido
 * una nueva brecha para extender una brecha en curso, y preferir una
brecha en seqx
 * para una brecha en seq y.
 */
nw()                                                              nw
{
        char        *px, *py;           /* seqs y ptrs */
        int         *ndely, *dely; /* seguir registro de dely */
        int         ndelx, delx;   /* seguir registro de delx */
        int         *tmp;          /* para barrido row0, row1 */
        int         mis;           /* puntuación para cada tipo */
        int         ins0, ins1;    /* inserción de penalizaciones */
        registro            id;            /* índice diagonal */
        registro            ij;            /* índice de jmp */
        registro            *col0, *col1; /* puntuación para última fila
actual */
        registro            xx, yy;        /* índice en seqs */

        dx = (estruct diag *)g_calloc("obtener diags", len0+len1+1,
sizeof(estruct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("obtener ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("obtener dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("obtener col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("obtener col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
```

```
smax = –10000;
si (endgaps) {
        para (col0[0] = dely[0] = –ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                col0[yy] = dely[yy] = col0[yy–1] – ins1;
                ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
además
        para (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                dely[yy] = –ins0;
/* cargar en matriz de coincidencia
 */
para (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* iniciar primera entrada en col
         */
        si (endgaps) {
                si (xx == 1)
                        col1[0] = delx = –(ins0+ins1);
                además
                        col1[0] = delx = col0[0] – ins1;
                ndelx = xx;
        }
        además {
                col1[0] = 0;
                delx = –ins0;
                ndelx = 0;
        }
```

Tabla 1 (cont')


```
        para (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
                mis = col0[yy-1];
                si (dna)
                        mis  +=  (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])?  DMAT  :
DMIS;
                además
                        mis += _día[*px-'A'][*py-'A'];

                /* actualizar penalización para del in x seq;
                 * favorecer nuevo del sobre del en curso
                 * ignorar MAXGAP si se pondera endgaps
                 */
                si (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                        si (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                                ndely[yy] = 1;
                        } además {
                                dely[yy] -= ins1;
                                ndely[yy]++;
                        }
                } además {
                        si (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                                ndely[yy] = 1;
                        } además
                                ndely[yy]++;
                }

                /* actualizar penalización para del en y seq;
                 * favorecer nuevo del sobre del en curso
```

```
*/
si (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        si (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
        } además {
                delx -= ins1;
                ndelx++;
        }
} además {
        si (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
        } además
                ndelx++;
}

/* elegir la puntuación máxima; we're favoring
 * mis sobre cualquier del y deux sobre dely
 */
```

...nw

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

Tabla 1 (cont')

```
además si (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    si (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis >
dx[id].puntuación+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        si (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].ajuste = ajuste;
            ajuste += sizeof(estruct jmp) +
sizeof(ajuste);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].puntuación = delx;
}
además {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
si (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis >
dx[id].puntuación+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        si (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].ajuste = ajuste;
```

```
                                        ajuste += sizeof(estruct jmp) +
sizeof(ajuste);
                                    }
                                }
                                dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                                dx[id].jp.x[ij] = xx;
                                dx[id].puntuación = dely[yy];
                            }
                            si (xx == len0 && yy < len1) {
                                /* last col
                                 */
                                si (endgaps)
                                    col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                                si (col1[yy] > smax) {
                                    smax = col1[yy];
                                    dmax = id;
                                }
                            }
                        }
                        si (endgaps && xx < len0)
                            col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
                        si (col1[yy-1] > smax) {
                            smax = col1[yy-1];
                            dmax = id;
                        }
                    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;            }
                    (nulo) libre((char *)ndely);
                    (nulo) libre((char *)dely);
                    (nulo) libre((char *)col0);
            (nulo) libre((char *)col1);                 }
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 *
 * print() — solo rutina visible fuera de este móduilo
 *
 * static:
 * getmat() — trazabilidad de la mejor vía, recuento de coincidencias,
impresión()
 * pr_align() — impresión de alineamiento descripto en la matriz p[]:
impresion()
 * dumpblock() — volcar un bloque de líneas con números, asteriscos:
pr_align()
 * nums() — sacar una línea de número: dumpblock()
 * putline() — sacar una línea (nombre, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * asteriscos() – –poner una línea de asteriscos: dumpblock()
 * stripname() — extraer alguna vía y prefijo de un seqname
 */

#incluye "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE    256    /* línea de salida máximo */
#define P_SPC     3      /* espacio entre nombre o num y seq */

extern _día[26][26];
int     olen;          /* ajustar longitud de línea de salida */
FILE    *fx;           /* archivo de salida */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, primera brecha, última brecha;     /* superposición */
```

```
        si ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: no se puede escribir %s\n", prog, ofile);
                limpieza(1);
        }
        fprintf(fx, "<primera secuencia: %s (longitud = %d)\n", nombrex[0],
len0);
        fprintf(fx, "<segunda secuencia: %s (longitud = %d)\n", nombrex[1],
len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        primera brecha = última brecha = 0;
        si (dmax < len1 – 1) {        /* brecha principal in x */
                pp[0].spc = primera brecha = len1 – dmax – 1;
                ly –= pp[0].spc;
        }
        además si (dmax > len1 – 1) {     /* brecha principal in y */
                pp[1].spc = primera brecha = dmax – (len1 – 1);
                lx –= pp[1].spc;
        }
        si (dmax0 < len0 – 1) {       /* seguimiento de brecha in x */
                última brecha = len0 – dmax0 –1;
                lx –= última brecha;
        }
        además si (dmax0 > len0 – 1) {    /* seguimiento de brecha in y */
                última brecha = dmax0 – (len0 – 1);
                ly –= última brecha;
        }
        getmat(lx, ly, primera brecha, última brecha);
pr_align();    }
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * trazabilidad de la mejor vía, recuento de coincidencias
 */
static
getmat(lx, ly, primera brecha, última brecha)                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "núcleo" (menos endgaps) */
        int     primera brecha, última brecha;          /* superposición de
rastreo pricipal */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double                  pct;
        registro                n0, n1;
        registro char *p0, *p1;
        /* obtener coincidencias totales, puntuación
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        mientras ( *p0 && *p1 ) {
                si (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0—;
                }
                además si (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
```

```
                siz1--;
        }
        además {
                si (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                        nm++;
                si (n0++ == pp[0].x[i0])
                        siz0 = pp[0].n[i0++];
                si (n1++ == pp[1].x[i1])
                        siz1 = pp[1].n[i1++];
                p0++;
                p1++;
        }
}

/* homología de pct:
 * si se penalizan endgaps, la base es la seq más corta
 * además, eliminar proyecciones y tomar el núcleo más corto
 */
si (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
además
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d coincidencia%s en una superposición% : %,2f por
ciento de semejanza\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

Tabla 1 (cont')

```
        fprintf(fx, "<brechas en primera secuencia: %d", gapx);                    ...getmat
        si (gapx) {
                (nulo) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residuo", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", brechas en segunda secuencia: %d", gapy);
        si (gapy) {
                (nulo) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residuo", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        si (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<puntuación: %d (coincidencia = %d, no coincidencia
= %d, penalización de brecha = %d + %d por base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        además
                fprintf(fx,
                "\n<puntuación: %d (Dayhoff PAM 250 matriz, penalización
de brecha = %d + %d por residuo)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        si (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalizado. Endgap izquierda: %d %s%s,
endgap derecha: %d %s%s\n",
                primera brecha, (dna)? "base" : "residuo", (primera brecha
== 1)? "" : "s",
                última brecha, (dna)? "base" : "residuo", (última brecha ==
1)? "" : "s");
        además
                fprintf(fx, "<endgaps no penalozadas\n");
```

```
}
 static         nm;          /* coincidenciales en el núcleo— para revisión
*/
 static         lmax;        /* longitudes de nombres de archivos secados
*/
 static         ij[2];       /* índice de jmp para una vía */
 static         nc[2];       /* número de inicio de línea actual */
 static         ni[2];       /* número de elemento actual — para
formación de brechas */
 static         siz[2];
 static char    *ps[2];      /* ptr al elemento actual */
 static char    *po[2];      /* ptr a la próximo espacio de char de salida */
 static char    out[2][P_LINE];      /* línea de salida */
 static char    star[P_LINE];/* ajustado asteriscos() */
/*
 * imprimir alineamiento descripto en la vía estructural pp[]
 */
static
pr_align()                                                          pr_align
{
        int             nn;     /* recuento de char */
        int             más;
        registro                i;

        para (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(nombrex[i]);
                si (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
```

```
po[i] = out[i];                    }
```

Tabla 1 (cont')

```
para (nn = nm = 0, más = 1; más; ) {                                    ...pr_align
        para (i = más = 0; i < 2; i++) {
                /*
                 * se tiene más de esta secuencia?
                 */
                si (!*ps[i])
                        continuar;
                más++;
                si (pp[i].spc) {        /* espacio principal */
                        *po[i]++ = ' ';
                        pp[i].spc—;
                }
                además si (siz[i]) {   /* en una brecha*/
                        *po[i]++ = '–';
                        siz[i]—;
                }
                además {                /* se coloca un elemento de seq
                                */
                        *po[i] = *ps[i];
                        si (islower(*ps[i]))
                                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                        po[i]++;
                        ps[i]++;
                        /*
                         * se está en la próxima brecha para esta seq?
                         */
```

```
                        si (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                /*
                                 * se necesita combinar todas las
brechas
                                 * en esta ubicación
                                 */
                                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                mientras (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                        siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                        }
                        ni[i]++;
                }
        }
        si (++nn == olen || !más && nn) {
                dumpblock();
                para (i = 0; i < 2; i++)
                        po[i] = out[i];
                nn = 0;
        }
    }
}
/*
 * vlcar un bloque de líneas que incluye números, asteriscos: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                    dumpblock
{
    registro    i;
    para (i = 0; i < 2; i++)
            *po[i]— = '\0';
```

Tabla 1 (cont')

...dumpblock

```
        (nulo) putc('\n', fx);
        para (i = 0; i < 2; i++) {
                si (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        si (i == 0)
                                nums(i);
                        si (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        si (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, asterisco);
                        si (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * sacar un número de línea: volcar()
 */
static
nums(ix)                                                                nums
        int     ix;     /* índice en out[] mantenimiento de línea seq */
{
        char            nline[P_LINE];
        registro                i, j;
        registro char *pn, *px, *py;
        para (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        para (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                si (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
```

```
                además {
                        si (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                para (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                si (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        además
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        para (pn = nline; *pn; pn++)
                (nulo) putc(*pn, fx);
        (nulo) putc('\n', fx);
}
/*
 * sacar una línea (nombre, [num], seq, [num]): volcar()
 */
static
putline(ix)                                                    putline
int     ix;                     {
```

Tabla 1 (cont')

...putline

```
        int             i;
        registro char *px;

        para (px = nombrex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (nulo) putc(*px, fx);
        para (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (nulo) putc(' ', fx);

        /* estos se cuentan desde 1:
         * ni[] es el elemento actual (de 1)
         * nc[] es el número del inicio de la línea actual
         */
        para (px = out[ix]; *px; px++)
                (nulo) putc(*px&0x7F, fx);
        (nulo) putc('\n', fx);
}


/*
 * poner una línea de asteriscos (seq siempre en out[0], out[1]): volcar()
 */
static
asteriscos()                                                    asteriscos
{
        int             i;
        registro char *p0, *p1, cx, *px;

        si (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
          !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
```

```
        return;
    px = asterisco;
    para (i = lmax+P_SPC; i; i—)
        *px++ = ' ';

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

            si (xbm[*p0–'A']&xbm[*p1–'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            además si (!dna && _día[*p0–'A'][*p1–'A'] > 0)
                cx = '.';
            además
                cx = ' ';
        }
        además
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * sacar vía o prefijo de pn, volver len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        char   *pn;    /* nombre de archivo (puede ser vía) */
{
        registro char *px, *py;

        py = 0;
        para (px = pn; *px; px++)
                si (*px == '/')
                        py = px + 1;
        si (py)
                (nulo) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * cleanup() — limpiar cualquier archivo tmp
 * getseq() — leer en seq, ajustar dna, len, maxlen
 * g_calloc() — calloc() con revisión de error
 * readjmps() — obtener los jmps buneos, del archivo tmp si es necesario
 * writejmps() — escribir una matriz cargada de jmps en un archivo tmp:
nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char   *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* archivo tmp para jmps */
FILE   *fj;
int    limpieza();                          /* limpieza de archivo tmp */
long   lseek();
/*
 * eliminar cualquier archivo tmp si se altera
 */
limpieza(i)                                                    cleanup
        int     i;
{
        si (fj)
                (nulo) eliminar(jname);
        exit(i);
}
/*
 * leer, volver ptr a seq, ajustar dna, len, maxlen
 * omitir líneas que comiencen con ';', '<', o '>'
 * seq en mayúsculas o minúsculas
 */
char   *
```

```
getseq(file, len)                                                    getseq
        char    *archivo;       /* nombre de archivo */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            línea[1024], *pseq;
        registro char *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        ARCHIVO             *fp;
        si ((fp = fopen(archivo,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: no se puede leer %s\n", prog, archivo);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(línea, 1024, fp)) {
                si (*línea == ';' || * línea == '<' || * línea == '>')
                        continuar;
                para (px = línea; *px != '\n'; px++)
                        si (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        si ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() no consiguió obtener %d bytes
para %s\n", prog, tlen+6, archivo);
                salida(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

Tabla 1 (cont')

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(línea, 1024, fp)) {
                si (*línea == ';' || *línea == '<' || *línea == '>')
                        continuar;
                para (px = línea; *px != '\n'; px++) {
                        si (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        además si (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        si (índice("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (nulo) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char  *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                   g_calloc
        char   *msg;        /* programa, rutina de llamada*/
        int    nx, sz;      /* número y tamaño de elementos */
{
        char            *px, *calloc();
        si ((px = calloc((sin signo)nx, (sin signo)sz)) == 0) {
                si (*msg) {
```

```
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() % de falloss (n=%d,
sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        salida(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * obtener jmps finales de dx[] o archivo tmp, ajustar pp[], restarurar dmax:
main()
 */
readjmps()                                                          readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        registro        i, j, xx;
        si (fj) {
                (nulo) fclose(fj);
                si ((fd = abrir(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: no se puede abrir () %s\n", prog,
jname);
                        limpieza(1);
                }
        }
        para (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        para (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >=
 xx; j--)
                                ;
```

Tabla 1 (cont')


```
                si (j < 0 && dx[dmax].ajuste && fj) {
                        (nulo) lseek(fd, dx[dmax].ajuste, 0);
                        (nulo)  lectura(fd,  (char  *)&dx[dmax].jp,
sizeof(estruct jmp));
                        (nulo)  lectura  (fd,  (char  *)&dx[dmax].ajuste,
sizeof(dx[dmax].ajuste));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP–1;
        }
                        además
                                break;          }
            si (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr,  "%s:  demasiadas  brechas  en  el
alineamiento\n", prog);
                limpieza(1);
            }
            si (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                si (siz < 0) {          /* brecha de segunda seq */
                    pp[1].n[i1] = –siz;
                    xx += siz;
                    /* id = xx – yy + len1 – 1
*/
                    pp[1].x[i1] = xx – dmax + len1 – 1;
                    gapy++;
                    ngapy –= siz;
/* ignorar MAXGAP cuando se hacen endgaps */
                    siz  =  (–siz  <  MAXGAP  ||  endgaps)?  –siz  :
MAXGAP;
```

```
                        i1++;
                    }
                    además si (siz > 0) {       /* brecha en la primera seq
*/
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignorar MAXGAP cuando se hacen endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz :
MAXGAP;
                        i0++;
                    }
                }
                Además
                ruptura;
        }
        /* revertir el orden de jmps */
        para (j = 0, i0—; j < i0; j++, i0—) {
                i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
                i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
        }
        para (j = 0, i1—; j < i1; j++, i1—) {
                i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
                i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
        }
        si (fd >= 0)
                (nulo) cerrar(fd);
        si (fj) {
                (nulo) eliminar(jname);
                fj = 0;
                ajuste = 0;
```

```
}                                   }
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * escribir un ajuste de estructura de jmp cargado de la previa (si hubiera):
nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        si (!fj) {
                si (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog,
jname);
                        limpieza(1);
                }
                si ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: no se puede escribir%s\n", prog,
jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (nulo) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(estruct jmp), 1, fj);
        (nulo) fwrite((char *)&dx[ix].ajuste, sizeof(dx[ix].ajuste), 1, fj);
}
```

III. Composiciones y métodos de la invención

La invención proporciona anticuerpos anti–FcRH5 o fragmentos funcionales de estos, y su método de uso en el tratamiento de tumores hematopoyéticos.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une, con preferencia específicamente, a cualquiera de los polipéptidos descriptos anteriormente o a continuación. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, que incluye Fab, Fab', $F(ab')_2$, y fragmento de Fv, diacuerpo, anticuerpo de dominio único, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena simple o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5 a su epitope antigénico respectivo. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina, que incluye, por ejemplo, una auristatina, un maytansinoide, un derivado de dolostatina o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden producir en las células CHO o células bacterianas y con preferencia inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para los fines de detección, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo a FcRH5 (por ejemplo afinidad del anticuerpo como fragmento Fab a FcRH5) es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo humano (por ejemplo afinidad del anticuerpo humano como fragmento Fab a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como fragmento Fab a FcRH5), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y un dominio

variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento Fab a FcRH5) es menor, por ejemplo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor, que la afinidad monovalente de un anticuerpo humano (por ejemplo, afinidad del anticuerpo humano como fragmento Fab a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo, afinidad del anticuerpo quimérico como fragmento Fab a FcRH5), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como fragmento Fab a FcRH5) es mayor, por ejemplo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10veces mayor, que la afinidad monovalente de un anticuerpo humano (por ejemplo, afinidad del anticuerpo humano como fragmento Fab a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como fragmento Fab a FcRH5), que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es sustancialmente igual a la afinidad de un anticuerpo humano (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como fragmento Fab a

FcRH5) en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es menor, por ejemplo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor, que la afinidad de un anticuerpo humano (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento de IgG a FcRH5) en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es mayor, por ejemplo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor, que la afinidad de un anticuerpo humano (por ejemplo afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) o un anticuerpo quimérico (por ejemplo afinidad del anticuerpo quimérico como un fragmento de IgG a FcRH5) en su forma bivalente, que comprende, consiste o consiste esencialmente en una cadena liviana y dominio variable de la secuencia de cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,4 Nm. En otro aspecto, la invención proporciona un

anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,4 nM +/– 0,04.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,3 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,32 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,36 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,4 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,44 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,48 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,5 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,3 nM y 0,5 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por

ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,32 nM y 0,48 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,36 nM y 0,44 nM.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,2 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,2 nM +/– 0,02.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,1 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,12 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,14 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,16 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,18 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a

FcRH5) es 0,2 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,22 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,24 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,26 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,28 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,30 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,1 nM y 0,3 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,12 nM y 0,28 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,14 nM y 0,26 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,16 nM y 0,24 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la

afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,18 nM y 0,22 nM.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,5 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,5 nM +/– 0,1.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,4 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,5 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,6 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) es 0,7 nM o mejor. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,3 nM y 0,7 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,4 nM y 0,6 nM. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la

afinidad del anticuerpo en su forma bivalente a FcRH5 (por ejemplo, afinidad del anticuerpo como una IgG a FcRH5) está entre 0,5 nM y 0,55 nM.

En un aspecto, la afinidad monovalente del anticuerpo humano a FcRH5 es sustancialmente igual a la afinidad de unión de un fragmento Fab que comprende secuencias del dominio variable de la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

Como está bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar usando alguno de una variedad de ensayos, y expresar en términos de una variedad de valores cuantitativos. Por consiguiente, en una forma de realización, la afinidad de unión se expresa como valores Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidez minimizados). En general y con preferencia, la afinidad de unión se mide *in vitro*, sea un escenario libre de células o asociado a células. Como se describe en mayor detalle en la presente, la diferencia de veces en la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la relación del valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo humanizado (por ejemplo, en forma de Fab) y el valor de afinidad de unión monovalente de un anticuerpo de referencia/comparador (por ejemplo, en la forma de Fab) (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene secuencias de la región hipervariable dadora), en donde los valores de afinidad de unión se determinan en condiciones de ensayo similares. En consecuencia, en una forma de realización, la diferencia de veces en la afinidad de unión se determina como la relación de los valores de Kd del anticuerpo humanizado en forma de Fab y dicho anticuerpo Fab referencia/comparador. Por ejemplo, en una forma de realización, si un anticuerpo de la invención (A) tiene una afinidad que es "3 veces menor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (M), entonces si el valor de Kd para A es 3x, el valor de Kd de M debe ser 1x, y la relación de Kd de A a Kd de M debe ser 3:1. A la inversa, en una forma de realización, si un anticuerpo de la invención (C)

tiene una afinidad que es "3 veces mayor" que la afinidad de un anticuerpo de referencia (R), entonces si el valor de Kd para C es 1x, el valor de Kd de R debe ser 3x, y la relación de Kd de C a Kd de R debe ser 1:3. Numerosos ensayos conocidos en la técnica, que incluye los descriptos en la presente, se pueden usar para obtener las mediciones de la afinidad de unión, que incluye, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende:

(a) al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas del grupo que consiste en:

(i) HVR–L1 que comprende la secuencia KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR–L2 que comprende la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR–L3 que comprende la secuencia QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR–H1 que comprende la secuencia GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR–H2 que comprende la secuencia ATISSGGSLTFILDSVR (SEQ ID NO: 36) y

(vi) HVR–H3 que comprende la secuencia PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37).

En una forma de realización, la HVR–L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 26. En una forma de realización, la HVR–L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27. En una forma de realización, la HVR–L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 28. En una forma de realización, la HVR–H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 35. En una forma de realización, la HVR–H2 de un anticuerpo de la invención comprende la

secuencia de la SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la HVR–H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación como se describe en la presente) es humanizado o humano.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende:

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

(i) HVR–L1 que comprende la secuencia KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR–L2 que comprende la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR–L3 que comprende la secuencia QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR–H1 que comprende la secuencia GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR–H2 que comprende la secuencia ATISSGGSLTFILDSVR (SEQ ID NO: 36) y

(vi) HVR–H3 que comprende la secuencia PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37); y

(b) al menos una variante de HVR en donde la secuencia de la variante de HVR comprende la modificación de al menos un residuo de la secuencia representada en la SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 35, 36 o 37. En una forma de realización, la HVR–L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 26. En una forma de realización, la HVR–L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27. En una forma de realización, la HVR–L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 28. En una forma de realización, la HVR–H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 35. En una forma de

realización, la HVR–H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 36. En una forma de realización, la HVR–H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación como se describe en la presente) es humanizado o humano.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR, en donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 35, 36 o 37, y en donde la SEQ ID NO: 26 corresponde a una HVR–L1, SEQ ID NO: 27 corresponde a HVR–L2, SEQ ID NO: 28 corresponde a una HVR–L3, SEQ ID NO: 35 corresponde a una HVR–H1, SEQ ID NO: 36 corresponde a una HVR–H2, y SEQ ID NO: 37 corresponde a una HVR–H3. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR–L1, la HVR–L2, la HVR–L3, la HVR–H1, la HVR–H2, y HVR–H3, en donde cada una, en orden, comprende las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 y 37.

Las variantes de HVR de un anticuerpo de la invención pueden tener modificaciones de uno o más residuos dentro de la HVR.

Un agente terapéutico para usar en un sujeto huésped con preferencia induce poca a ninguna respuesta inmunogénica contra el agente en dicho sujeto. En una forma de realización, la invención proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que induce y/o se espera que induzca una respuesta al anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) a un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 18 & 20 en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que induce y/o se espera que induzca respuesta mínima o ninguna al anticuerpo anti-ratón humano (HAMA). En un ejemplo, un

anticuerpo de la invención induce una respuesta al anticuerpo anti-ratón que está en un nivel clínicamente aceptable o menor.

Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias de la región no hipervariable humana y/o de consenso (por ejemplo, estructural) su dominio variable de la cadena pesada y/o liviana. En algunas formas de realización, están una o más modificaciones adicionales dentro de las secuencias de la región no hipervariable humanas y/o de consenso humanas. En una forma de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia estructural de consenso humana, que en una forma de realización es la secuencia estructural de consenso del subgrupo III. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia estructural de consenso del subgrupo III modificada al menos en una posición de aminoácido. En una forma de realización, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia estructural de consenso humana, que en una forma de realización es la secuencia estructural de consenso κI. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia estructural de consenso κI modificada en menos una posición de aminoácido.

Como es sabido en la técnica, y como se describe con mayor detalle en la presente a continuación, el diseño de la posición/límite de aminoácido de una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, de acuerdo con el contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (como se describe a continuación). Algunas posiciones de un dominio variable se pueden considerar como posiciones hipervariables híbridas ya que se estima que estas posiciones están dentro de la región hipervariable bajo un conjunto de criterios mientras que se estima que está fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones se pueden hallar en regiones hipervariables extendidas (como se describen adicionalmente más

adelante). La invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones es estas posiciones hipervariables híbridas. En una forma de realización, estas posiciones hipervariables incluyen una o más posiciones 26–30, 33–35B, 47–49, 57–65, 93, 94 y 101–102 en un dominio variable de la cadena pesada. En una forma de realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más posiciones 24–29, 35–36, 46–49, 56 y 97 en un dominio variable de la cadena liviana. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende una una variante humana de la secuencia estructural de consenso del subgrupo humano modificada en una o más posiciones hipervariables híbridas.

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

En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende una variante de la secuencia estructural de consenso del subgrupo I kappa humano modificada en una o más de las posiciones 24, 27–29, 56 y 97.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende a variante de la secuencia estructural de consenso del subgrupo III humano modificada en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o todas las posiciones 26–30, 33–35, 48–49, 58, 60–63, 93 y 101.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende una variante de la secuencia estructural de consenso del subgrupo I kappa humano modificada en 1, 2, 3, 4, 5 o todas las posiciones 24, 27–29, 56 y 97.

Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquiera de las secuencias estructurales de cadena liviana humana o de consenso humana, con la condición de que el anticuerpo exhiba las características

biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende al menos una porción (o el total) de la secuencia estructural de cadena liviana κ humana. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende al menos una porción (o el total) de secuencia de consenso estructural del subgrupo I κ humana.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende a dominio variable de la cadena pesada y/o liviana que comprende secuencia estructural descripta en las Figuras 9–11.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado conjugado a un agente citotóxico. En un aspecto, el anticuerpo anti–FcRH5 humanizado conjugado a un agente citotóxico inhibe la progresión del tumor en xenoinjertos.

En un aspecto, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico son monovalentes. En una forma de realización, el anticuerpo humanizado y quimérico comprende una región de Fab única unida a una región de Fc. En una forma de realización, el anticuerpo de referencia quimérico comprende las secuencias del dominio variable que se ilustran en la Figura 2 (SEQ ID NO: 11) y la Figura 4 (SEQ ID NO: 13) ligadas a una región de Fc humana. En una forma de realización, la región de Fc humana es la de una IgG (por ejemplo, IgG1, 2, 3 o 4).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, la HVR2–HC y/o HVR3–HC que se ilustra en las Figuras 9–11. En una forma de realización, el dominio variable comprende la secuencia de FR1–HC, FR2–HC, FR3–HC y/o FR4–HC que se ilustra en la Figuras 9–11. En una forma de realización, el anticuerpo comprende la secuencia de CH1 y/o Fc que se ilustra en la Figura 11. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, la HVR2–HC y/o HVR3–HC La Figuras 10–11, y la secuencia de FR1–HC,

FR2–HC, FR3–HC y/o FR4–HC en las Figuras 10–11. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, la HVR2–HC y/o HVR3–HC de las Figuras 10–11, y la secuencia de CH1 y/o Fc que se ilustra en la Figura 11. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, la HVR2–HC y/o HVR3–HC en las Figuras 10–11, y la secuencia de FR1–HC, FR2–HC, FR3–HC y/o FR4–HC en las Figuras 10–11, y la CH1 y/o Fc (Figura 11).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de HVR1–LC, la HVR2–LC y/o HVR3–LC que se ilustra en las Figuras 9 y 11. En una forma de realización, el dominio variable comprende la secuencia de FR1–LC, FR2–LC, FR3–LC y/o FR4–LC que se ilustra en la Figuras 9 y 11. En una forma de realización, el anticuerpo comprende la secuencia de CL1 que se ilustra en la Figura 11. En una forma de realización, el anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de HVR1–LC, la HVR2–LC y/o HVR3–LC, y la secuencia de FR1–LC, FR2–LC, FR3–LC y/o FR4–LC que se ilustra en la Figuras 9 y 11. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de HVR1–LC, la HVR2–LC y/o HVR3–LC, y la secuencia de CL1 que se ilustra en la Figuras 9 y 11. En una forma de realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de HVR1–LC, la HVR2–LC y/o HVR3–LC, y la secuencia de FR1–LC, FR2–LC, FR3–LC y/o FR4–LC que se ilustra en la Figuras 9 y 11, y la secuencia de CL1 que se ilustra en la Figura 11.

En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo original ase reemplazan con un aminoácido de cisteína libre

como se describe en WO2006/034488; US 2007/0092940 (que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Cualquier forma de anticuerpo anti–FcRH5 también se puede manipular genéticamente, es decir, mutar. Por ejemplo, un fragmento Fab del anticuerpo original se puede manipular genéticamente para formar un Fab manipulado genéticamente en cisteína, denominado en la presente como "TioFab". De modo similar, un anticuerpo monoclonal original se puede manipular genéticamente para formar un "TioMab." Cabe mencionar que una mutación de un solo sitio produce un solo residuo de cisteína manipulado genéticamente en un TioFab, a la vez que un solo sitio de mutación produce dos residuos de cisteína manipulados genéticamente en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que unen con preferencia polipéptidos de FcRH5 asociados a células. Un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína alternativamente puede comprender un anticuerpo que comprende una cisteína en una posición descripta en la presente en el anticuerpo o el Fab, que provenga del diseño de la secuencia y/o la selección del anticuerpo, sin alterar necesariamente un anticuerpo original, tal como por diseño y selección de anticuerpo por despliegue en fago o a través del diseño de novo de las secuencias estructurales y regiones contantes de cadena liviana y/o cadena pesada. Un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre que tiene un valor de reactividad de tiol en los rangos de 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0 o 0,8 a 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que ha sido manipulado genéticamente en el anticuerpo original y no es parte de un puente disulfuro. Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína son útiles para la unión de compuesto citotóxicos y/o de imágenes en el sitio

de la cisteína manipulada genéticamente a través de, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica del grupo funcional tiol de un residuo de Cys a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con cualquier otro grupo funcional de aminoácido de una proteína, tal como el grupo amino de los residuos de lisina o el grupo amino N–terminal. La funcionalidad específica del tiol en los reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con los grupos aminos, pero se requieren mayor pH (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non–Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

En un aspecto, un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína de la invención comprende una cisteína manipulada genéticamente en una posición adecuada, donde la posición se numera de acuerdo con Kabat et al. en la cadena liviana (ver Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y de acuerdo con la numeración de EU en la cadena pesada (que incluye la región de Fc) (ver Kabat et al. (1991), supra).

En un aspecto, la invención incluye un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre en donde el anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína se une a un polipéptido de FcRH5 y se prepara para un proceso que comprende reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 origina por cisteína en donde el anticuerpo original comprende al menos una secuencia de HVR descripta en la presente.

En un determinado aspecto, la invención trata de un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia de aminoácidos, con un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en la presente, o un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se describe en la presente.

En otro aspecto más, la invención trata de un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que tiene a secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en la presente, (b) a anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se describe en la presente, (c) un dominio extracelular de una proteína de transmembrana del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína, con o sin el péptido señal, como se describe en la presente, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descriptas en la presente o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de un secuencia de aminoácidos del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de longitud completa como se describe en la presente.

En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína aislado sin la secuencia señal N–terminal y/o sin la metionina inicial y está codificada por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos como se describe en la presente. Los procesos para producirlos también se describen en la presente, en donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende molécula de ácido nucleico codificadora apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo manipulado

genéticamente en cisteína y recuperar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína del cultivo celular.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína aislado que tienen eliminado el dominio de transmembrana o inactivado el dominio de transmembrana. Los procesos para producirlos también se describen en la presente, en donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende molécula de ácido nucleico codificadora apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína y recuperar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína del cultivo celular.

En otros aspectos, la invención proporciona anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína quiméricos y aislados que comprenden cualquiera de los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína descriptos en la presente fusionados a un polipéptido heterólogo (no FcRH5). Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína fusionados a un polipéptido heterólogo tal como, por ejemplo, una secuencia de la marca del epitope o una región de Fc de una inmunoglobulina.

El anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena simple o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5 a su respectivo epitope antigénico. Los anticuerpos de la presente invención opcionalmente se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tales como una toxina, que incluye, por ejemplo, una auristatina, un maytansinoide, un derivado de dolostatina o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los anticuerpos de la

presente invención opcionalmente se pueden producir en células CHO o células bacterianas y con preferencia inhiben el crecimiento o proliferación o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines diagnósticos, los anticuerpos de la presente invención se puede marcar en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

En otros aspectos de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti–FcRH5 y anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína descriptos en la presente. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de E. coli, o células de levaduras. También se un proceso para producir cualquiera los polipéptidos descriptos en la presente y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen anticuerpos específicos para receptores de la superficie celular y receptores de transmembrana, y antígenos asociados al tumor (TAA). Dichos anticuerpos se pueden usar como anticuerpos desnudos (no conjugados a un fármaco o residuo de marca) o como conjugados de anticuerpo–fármaco (ADC). Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína de la invención se pueden acoplarse al sitio en forma específica y eficiente con un agente reactivo con tiol. El agente reactivo con tiol puede ser un reactivo ligador multifuncional, un reactivo de marca de captura, un reactivo fluoróforo, o un intermediario fármaco-ligador. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína se puede marcar con una marca detectable, inmovilizar en un soporte de fase sólida y/o conjugar con un residuo de fármaco. La reactividad tiol se puede generalizar en cualquier anticuerpo donde la sustitución de aminoácidos con aminoácidos de cisteína

reactivos se puede realizar dentro de los rangos de la cadena liviana seleccionados de los rangos de aminoácido: L10–L20, L105–L115, L109–L119, L116–L126, L122–L132, L163–L173, L200–L210; y dentro de los rangos en la cadena pesada seleccionados de los rangos de aminoácido: H1–H10, H18–H28, H79–H89, H107–H117, H109–H119, H111–H121, y en la región de Fc dentro de los rangos seleccionados de H270–H280, H366–H376, H391–401, donde la numeración de las posiciones de aminoácido comienza en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa sucesivamente de aquí en adelante como se describe en WO2006034488; US 2007/0092940. La reactividad tiol también se puede generalizar a ciertos dominios de un anticuerpo, tales como el dominio constante de la cadena liviana (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los reemplazos de cisteína que originan valores de reactividad de tiol de 0,6 y superiores se pueden realizar en los dominios constantes de la cadena pesada α, δ, ε, γ, y μ de los anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, respectivamente, que incluye las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Dichos anticuerpos y sus usos se describen en WO2006/034488; US 2007/0092940.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína de la invención con preferencia retienen la capacidad de unión al antígeno de sus contrapartes del anticuerpo original, de tipo salvaje. En consecuencia, los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína son capaces de unirse, con preferencia específicamente, a antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), proteínas del receptor de superficie celular y otras moléculas de superficie celular, proteínas de transmembrana, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con el desarrollo o

diferenciación de tejido (por ejemplo, conocidas o sospechadas de contribuir funcionalmente), lifoquinas, citoquinas, moléculas involucradas en la regulación del ciclo celular, moléculas involucradas en la vasculogénesis y moléculas asociadas con la angiogénesis (por ejemplo, conocidas o sospechadas de contribuir funcionalmente). El antígeno asociado al tumor puede ser un factor de diferenciación del grupo (es decir, una proteína de CD, que incluye pero sin limitación FcRH5). Los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína de la invención retienen la capacidad de unión al antígeno de sus contrapartes del anticuerpo anti–FcRH5 original. En consecuencia, los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína de la invención son capaces de unir, con preferencia específicamente, a los antígenos de FcRH5 que incluyen las isoformas beta y/o alfa humanas de anti–FcRH5, que incluye cuando estos antígenos se expresan en la superficie de las células, que incluyen, sin limitación, las células B.

En un aspecto, los anticuerpos de la invención se puede conjugar con cualquier residuo de marca que puede estar unida covalentemente al anticuerpo a través de un residuo del reactivo, un residuo activado o un grupos de tiol de la cisteína reactivo (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147–15; Harlow E. y lane, D. (1999) Using Anticuerpos: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modificación, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). La marca unida puede actuar para: (i) proveer una marca detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable provista por la primera o segunda marca, por ejemplo para dar FRET (transferencia de energía de resonancia por fluorescencia); (iii) estabilizar interacciones o aumentar la eficacia de unión con el antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética o permeabilidad celular, por carga, hidrofobicidad, marca u otros parámetros físicos, o (v) proporcionar una

residuo de captura, para modular la afinidad al ligando, unión del anticuerpo/antígeno o formación de complejos iónicos.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína marcados pueden ser útiles en ensayos diagnósticos, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos específicos o suero. Para las aplicaciones diagnósticas, el anticuerpo se marcará normalmente con un residuo detectable. Numerosas marcas que están disponibles se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

Los radioisótopos (radionucleidos) tales como ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, o ^{213}Bi. Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en los experimentos de imágenes dirigidos al receptor. El anticuerpo se puede marcar con reactivos de ligando que se une, quela o forma complejo de otro modo con un metal radioisótopo donde el agente es reactive con el tiol de la cisteína manipulado genéticamente del anticuerpo, usando las técnicas descriptas en Current Protocols in Immunology, Volumes 1 y 2, Coligen et al, Ed. Wiley–Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden formar complejo con un ion metálico incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los radionucleidos se pueden dirigir por medio de la formación de complejos con los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención (Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137–1146).

Los reactivos ligadores tales como DOTA–maleimida (4–maleimidobutiramidobencil–DOTA) se puede preparar por la reacción de aminobencil–DOTA con ácido 4–maleimidobutírico (Fluka) activado con isopropilcloroformato (Aldrich), después del procedimiento de Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802–1807). Los reactivos de DOTA–maleimida reaccionan con los aminoácidos de cisteína libre de los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína y proveen un ligando que forma complejo con el metal sobre el anticuerpo (Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72–86). Los reactivos de marcación de ligadores

quelantes tales como DOTA–NHS (mono (N–hidroxisuccinimida éster del ácido 1,4,7,10–tetraazaciclododecano–1,4,7,10–tetraacético) están disponibles en el comercio (Macrocyclics, Dallas, TX). Las imágenes del direccionamiento al receptor con anticuerpos marcados con radionucleidos pueden proporcionar un marcador de activación de la vía para la detección y la cuantificación de la acumulación progresiva de anticuerpos en el tejido tumoral (Albert et al (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207–1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación lisosómica.

Los complejos de metal-quelato adecuados como marcas de anticuerpo para los experimentos de imágenes se describen: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) J. Immunol. Methods 65:147–157; Meares et al (1984) Anal. Biochem. 142:68–78; Mirzadeh et al (1990) Bioconjugate Chem. 1:59–65; Meares et al (1990) J. Cáncer1990, Suppl. 10:21–26; Izard et al (1992) Bioconjugate Chem. 3:346–350; Nikula et al (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387–90; Camera et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955–62; Kukis et al (1998) J. Nucl. Med. 39:2105–2110; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663–1670; Camera et al (1994) J. Nucl. Med. 21:640–646; Ruegg et al (1990) Cáncer Res. 50:4221–4226; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663–1670; Lee et al (2001) Cáncer Res. 61:4474–4482; Mitchell, et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1105–1112; Kobayashi et al (1999) Bioconjugate Chem. 10:103–111; Miederer et al (2004) J. Nucl. Med. 45:129–137; DeNardo et al (1998) Clinical Cáncer Research 4:2483–90; Blend et al (2003) Cáncer Bioterapia & Radiopharmaceuticals 18:355–363; Nikula et al (1999) J. Nucl. Med. 40:166–76; Kobayashi et al (1998) J. Nucl. Med. 39:829–36; Mardirossian et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65–74; Roselli et al (1999) Cáncer Bioterapia & Radiopharmaceuticals, 14:209–20.

Las marcas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), tipo fluoresceínas que incluye FITC, 5–carboxifluoresceína, 6–carboxi fluoresceína; tipo rodaminas que incluye TAMRA; dansilo; Lissamina; cianinas; ficoetritrinas; rojo de Texas y sus análogos. La marcas fluorescentes se pueden conjugar a los anticuerpos usando las técnicas descriptas, por ejemplo en Current Protocols in Immunology, supra. Los reactivos colorantes fluorescentes y marcas fluorescentes incluyen los disponibles en el comercio en Invitrogen/Molecular Probes (Eugeno, O) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Varias marcas de enzima–sustrato están disponibles o descriptas (US 4275149). La enzima generalmente cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que se puede medir usando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia se describió anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y luego puede emitir luz que se puede medir (usando, por ejemplo un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor de fluorescencia. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; US 4737456), luciferina, 2,3–dihidroftalazinodionas, malato dehidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β–galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa–6–fosfato deshidrogenasa), heterocíclico oxidasas (tales como uricasa y xantino oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a los anticuerpos se describen en O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme–Antibody

Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147–166.

Ejemplos combinaciones de enzima–sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano (HRP) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'–tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para–nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

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

Otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general, ver US 4275149 y US 4318980.

Una marca se puede conjugar indirectamente con una cadena lateral de aminoácido, una cadena lateral de aminoácido activada, una anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres categorías generales de marcas mencionadas anteriormente se puede conjugar con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a estreptavidina y en consecuencia, la marca se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante del polipéptido, la variante del polipéptido se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente se conjuga con una variante del polipéptido anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti–digoxina). En consecuencia, se puede lograr la conjugación indirecta de la marca con la

variante del polipéptido (Hermanson, G. (1996) en Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

El anticuerpo de la presente invención se puede emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) Monoclonal Anticuerpos: A Manual of Techniques, pp,147–158, CRC Press, Inc.).

Una marca de detección puede ser útil para localizar, visualizar, y cuantificar un evento de unión o reconocimiento. Los anticuerpos de la invención marcados pueden detectar receptores en la superficie celular. Otro uso de anticuerpos marcados en forma detectable es un método de inmunocaptura basado en microesferas que comprende conjugar una microesfera con un anticuerpo marcado con fluorescencia y detectar una señal de fluorescencia después de la unión de un ligando. Las metodologías de detección de unión similares utilizan el efecto de resonancia del plasmón superficial (SPR) para medir y detectar las interacciones anticuerpo–antígeno.

Las marcas de detección tales como colorantes fluorescentes y colorantes quimioluminiscentes (Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines y Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin–Trans. 1:1051–1058) proporcionan una señal detectable y en general son aplicables para marcar anticuerpos, con preferencia con las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal muy alta con umbral bajo de modo que se puedan detectar en forma sensible pequeñas cantidades de anticuerpos en los ensayos libres de células y basados en células; y (ii) el anticuerpo marcado debe ser fotoestable de modo que la señal fluorescente se pueda observar, monitorear y registrar sin fotoblanqueamiento significativo. Para aplicaciones que involucran la unión a la superficie celular del anticuerpo marcado a las membranas o superficies celulares, en especial células vivas, las marcas con preferencia (iii) tienen buena

solubilidad en agua para obtener la concentración del conjugado y la sensibilidad efectivas y (iv) son no tóxicas para las células vivas de modo que no alteran los procesos metabólicos normales de las células o causan muerte celular prematura.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia celular y la enumeración de eventos marcados con fluorescencia, por ejemplo, la unión de los conjugados de péptido-colorante a la superficie celular se puede realizar en un sistema (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza ensayos no radiactivos de mezcla y lectura con células vivas o microesferas (Miraglia, "Homogeneous cell– y bead–based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193–204). Los usos de anticuerpos marcados también incluye ensayos de unión al receptor de la superficie celular, ensayos de inmunocaptura, ensayos inmunoabsorbentes ligados a fluorescencia (FLISA), escisión de caspasa (Zheng, "Caspase–3 controls both citoplasmic y nuclear events asociated with Fas–mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618–23; US 6372907), apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow citometric detection of fosfatidilserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39–51) y ensayos de citotoxicidad. La tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico se puede usar para identificar la regulación por aumento o disminución por una molécula que se dirige a la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high–throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143–51).

Los anticuerpos de la invención marcados son útiles como biomarcadores y sondas de imágenes por diversos métodos y técnicas de imágenes biomédicas y moleculares tales como: (i) MRI (imagen de resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computada); (iii) SPECT

(tomografía computada de emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía de emisión de positrones) Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41–49; (v) bioluminescencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonido. La inmunocentellografía es un procedimiento de imágenes en el que los anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un paciente animal o humano y se toma una foto de sitios del cuerpo donde se localiza el anticuerpo (US 6528624). Los biomarcadores de imágenes se pueden medir objetivamente y evaluar como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: Tipo 0 son marcadores de la historia natural de una enfermedad y se correlacionan en forma longitudinal con índices clínicos conocidos, por ejemplo evaluación de MRI de la inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores Tipo I capturan el efecto de una intervención de acuerdo con un mecanismo de acción, aun cuando el mecanismo puede no estar asociado con la evolución clínica; los marcadores Tipo II actúan como puntos finales sustitutos donde el cambio, o forma de señal del biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta específica, tal como erosión ósea medida en artritis reumatoide por CT. Los biomarcadores de imágenes en consecuencia pueden proveer información terapéutica farmacodinámica (PD) acerca de: (i) expresión de una proteína blanco, (ii) unión de un agente terapéutico a la proteína blanco, es decir selectividad y (iii) datos farmacocinéticas de depuración y vida media. Las ventajas de los biomarcadores de imágenes in vivo respecto de los biomarcadores de laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificable, evaluación del cuerpo completo, dosificación y evaluación repetida, es decir, puntos de tiempo múltiples y efectos potencialmente transferibles de los resultados preclínicos (animales pequeños) a clínicos (seres humanos), En algunas aplicaciones, el análisis de bioimágenes suplanta o minimiza la cantidad de experimentos en animales en los estudios preclínicos.

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

Los péptidos y proteinas marcadas con dos residuos, un indicador fluorescente e inactivador en suficiente proximidad experimentan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los grupos indicadores son normalmente colorantes fluorescentes que se excitan por la luz a una determinada longitud de onda y transfieren energía a un grupo aceptor o inactivador, con el desplazamiento de Stokes apropiado para la emisión a máxima brillo. Los colorantes fluorescentes incluyen moléculas con aromaticidad extendida, tal como fluoresceína y rodamina, y sus derivados. El indicador fluorescente puede ser inactivado en forma parcial o significativa por el residuo inactivador en un péptido intacto. Despues de la escisión del péptido por una peptidasa o proteasa, se puede medir un aumento detectable de fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18–34).

Los anticuerpos de la invención marcados también se pueden usar como agente de purificación de afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza en una fase sólida tal como resina de Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno por purificar, y a partir de aquí el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el antígeno que se purifica, que está unido a la variante del polipéptido inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado, tal como buffer de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante del polipéptido.

Los reactivos de marcación normalmente portan grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar (i) directamente con un tiol de la cisteína de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína para formar un anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo ligador para formar un intermediario ligador-marca o (iii) con un anticuerpo ligador para formar un anticuerpo marcado. Los grupos funcionales reactivos de los reactivos de marcación incluyen: maleimida, haloacetilo, succinimidil éster de yodoacetamida (por ejemplo NHS, N–hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 2,6–diclorotriacinilo, éster pentafluorofenílico y fosforamidita, si bien también se pueden usar otros grupos funcionales.

Un ejemplo de grupo funcional es éster N–hidroxisuccinimidílico (NHS) de un sustituyente grupo carboxilo de una marca detectable, por ejemplo biotina o un colorante fluorescente. El éster NHS de una marca se puede preformar, aislar, purificar y/o caracterizar, o se puede formar in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Normalmente, la forma carboxilo de la marca se activa por la reacción con alguna combinación de un reactivo carbodiímida, por ejemplo diciclohexilcarbodiímida, diisopropilcarbodiímida, o un reactivo de uronio, por ejemplo TSTU (tetrafluoroborato de O–(N–Succinimidil)–N,N,N',N'–tetrametiluronio, HBTU (hexafluorofosfato de O–benzotriazol–1–il)–

N,N,N',N'–tetrametiluronio), o HATU (hexafluorofosfato de O–(7–azabenzotriazol–1–il)–N,N,N',N'–tetrametiluronio), un activador, tal como 1–hidroxibenzotriazol (HOBt), y N–hidroxisuccinimida para dar el éster NHS de una marca. En algunos casos, la marca y los anticuerpos se pueden acoplar por activación in situ de la marca y la reacción con el anticuerpo para formar el conjugado de marca–anticuerpo en una etapa. Otros reactivos de activación y acoplamiento incluyen TBTU (hexafluorofosfato de 2–(1H–benzotriazo–1–il)–1–1,3,3–tetrametiluronio), TFFH (2–fluoro–hexafluorofosfato de N,N',N",N'"–tetrametiluronio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol–1–il–oxi–tris–pirrolidino–fosfonio, EEDQ (2–etoxi–1–etoxicarbonil–1,2–dihidro–quinolina), DCC (diciclohexilcarbodiímida); DIPCDI (diisopropilcarbodiímida), MSNT (1–(mesitilen–2–sulfonil)–3–nitro–1H–1,2,4–triazol, y haluros de arilsulfonilo, por ejemplo cloruro de triisopropilbencensulfonilo.

Péptido de unión al compuesto aluminio–Fab de la invención:

En un aspecto, el anticuerpo de la invención se fusiona a una proteína de unión a albúmina. La unión de proteína-plana puede ser un medio efectivo de mejorar las propiedades farmacocinéticas de moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína más abundante en plasma. Los péptidos de unión al aluminio (ABP) del suero pueden alterar la farmacodinámica de las proteínas del dominio activo fusionado, que incluye la alteración de la absorción, penetración, y difusión en el tejido. Estos parámetros farmacodinámicos se puede modular por la selección especifica de la secuencia de péptido de unión al aluminio apropiada (US 20040001827). Se identificó una serie de péptidos de unión al aluminio por prueba de despliegue en fago (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035–35043; WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen la secuencias ABP descriptas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035–35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) US 20040001827 a [0076] SEQ ID NOS: 9–22; y (iii) WO

01/45746 en las páginas 12–13, las cuales se incorporan en la presente por referencia. Los (ABP)–Fab de unión a albúmina están manipulados genéticamente por la fusión de un péptido de unión al aluminio al extremo C–terminal de la cadena pesada del Fab en una relación estequiométrica 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Se demostró que la asociación de estos ABP–Fabs con albúmina aumentó la vida media del anticuerpo en más de 25 veces en conejos y ratones. Los residuos de Cys reactivos descriptos anteriormente en consecuencia se pueden introducir en estos ABP–Fab y se usan para la conjugación especifica de sitio con fármacos citotóxicos seguido por los estudios en animales in vivo.

Los ejemplos de secuencias del péptido de unión al aluminio incluyen, pero sin limitación las secuencias de aminoácidos listadas en las SEQ ID NOS: 53–57:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 53

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 54

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 55

RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO: 56

DICLPRWGCLW SEQ ID NO: 57

Conjugados de anticuerpo y fármaco

En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, o conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de esta), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención

además proporciona métodos de usar los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anteriores anticuerpos anti–FcRH5 unidos covalentemente a un agente citotóxico o un agente detectable.

En un aspecto, un anticuerpo de FcRH5 de la invención se une al mismo epitope de FcRH5 unido por otro anticuerpo de FcRH5.

En otro aspecto, a anticuerpo de FcRH5 de la invención se une a un epitope de FcRH5 distinto del epitope unido por otro anticuerpo de FcRH5.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se une específicamente a FcRH5 de una primera especie animal, y no se une específicamente a FcRH5 de una segunda especie animal. En una forma de realización, la primera especie animal es humana y/o primate (por ejemplo, mono cinomolgus), y la segunda especie animal es murina (por ejemplo, ratón) y/o canina. En una forma de realización, la primera especie animal es humana. En una forma de realización, la primera especie animal es primate, por ejemplo mono cinomolgus. En una forma de realización, la segunda especie animal es murina, por ejemplo ratón. En una forma de realización, la segunda especie animal es canina.

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

En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de FcRH5 de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Se puede usar cualquiera de una variedad de células huésped. En una forma de realización, una célula huésped es una

célula procariótica, por ejemplo, *E. coli*. En una forma de realización, una célula huésped es una célula eucariótica, por ejemplo una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

En un aspecto, la invención proporciona métodos para obtener un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un método de obtener un anticuerpo de FcRH5 (que, como se define en la presente incluye longitud completa y fragmentos de este), dicho método que comprende expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento de este), y recuperar dicho anticuerpo.

En un aspecto, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, en donde la composición comprende uno o más anticuerpos FcRH5 de la invención. En una forma de realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo también comprende un portador, que en algunas formas de realización es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un artículo de manufactura de la invención además comprende instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos FcRH5 de la invención; y un segundo recipiente que comprende u buffer. En una forma de realización, el buffer es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo antagonista además comprende un portador, que en algunas formas de realización es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un kit además comprende instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de FcRH5 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de manufactura de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tales como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibir el crecimiento de una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo de la invención de este modo causa una inhibición del crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa FcRH5, dicho método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se trata efectivamente a dicho mamífero. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado con aumento de expresión de FcRH5, dicho método comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se puede tratar o prevenir efectivamente dicho trastorno proliferativo celular. En una forma de realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula, en donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo inhibir el crecimiento de dicha célula. En una forma de realización, el

anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención, de este modo se trata efectivamente dicho tumor. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratar cáncer que comprende administrar a un paciente la formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado descripta en la presente, diluyente, portador o excipiente aceptable. En una forma de realización, el cáncer se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, se administra al paciente un agente citotóxico en combinación con el compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco.

En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibir la proliferación de las células B que comprende exponer una célula a un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a FcRH5. En una forma de realización, la proliferación de las células B se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda

(ALL) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, la célula B es un xenoinjerto. En una forma de realización, la exposición tiene lugar in vitro. En una forma de realización, la exposición tiene lugar in vivo.

En un aspecto, la invención proporciona un método de determinar la presencia de FcRH5 en una muestra que se sospecha que contiene FcRH5, dicho método que comprende exponer dicha muestra a un anticuerpo de la invención, y determinar la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra en donde la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra es indicativo de la presencia de dicha proteína en dicha muestra. En una forma de realización, la muestra es una muestra biológica. En una forma de realización adicional, la muestra biológica comprende las células B. En una forma de realización, la muestra biológica es un mamífero que experimenta o se sospecha que experimenta un trastorno de las células B y/o un trastorno proliferativo de las células B que incluye, pero sin limitación, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL) y linfoma de células del manto.

En un aspecto, se proporciona un método de diagnosticar un trastorno proliferativo celular asociado con un aumento de las células, tales como las células B, que expresa FcRH5, el método que comprende poner en contacto las células de ensayo en una muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores; determinar el nivel de anticuerpo unido a las células de ensayo en la muestra por la detección de la unión del anticuerpo a FcRH5; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra control, en donde el nivel de anticuerpo unido se normaliza a la cantidad de células que expresan FcRH5 en las muestras de ensayo y control, y en donde un nivel superior de anticuerpo unido en la muestra de ensayo en comparación con la muestra control indica la

presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan FcRH5.

En un aspecto, un método de detectar FcRH5 soluble en sangre o suero, el método que comprende poner en contacto una muestra de ensayo de sangre o suero de un mamífero que se sospecha que experimenta un trastorno proliferativo de las células B con un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención y detectar un aumento de FcRH5 soluble en la muestra de ensayo con respecto a una muestra control de sangre o suero de un mamífero normal. En una forma de realización, el método de detectar es útil como método de diagnosticar un trastorno proliferativo de las células B asociado con un incremento de FcRH5 soluble en sangre o suero de un mamífero.

En un aspecto, un método de unir un anticuerpo de la invención a una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha células con un anticuerpo de la invención. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico. En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

Los métodos de la invención se pueden usar para afectar cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con la expresión de FcRH5. En una forma de realización, una célula a la que se dirige un método de invención es una célula hematopoyética. Por ejemplo, una célula hematopoyética puede ser una que se selecciona del grupo que consiste en linfocito, leucocito, plaqueta, eritrocito y célula citolítica natural. En una forma de realización, una célula a la que se dirige un método de invención es una célula B o célula T. En una forma de realización, una célula a la que se dirige un método de invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de linfoma, célula de leucemia, o célula de mieloma.

Los métodos de la invención también pueden comprender etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una forma de realización, un método además comprende una etapa en donde una célula y/o tejido localizada selectivamente (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone el tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

Como se describe en la presente, se ha observado que la expresión de FcRH5 (o IRTA2) está desregulada en líneas celulares de mieloma múltiple y linfoma de Burkitt. Por consiguiente, en una forma de realización de los métodos de la invención, una célula que es localizada selectivamente (por ejemplo, una célula cancerosa) es una en que FcRH5 se expresa en comparación con una célula que no expresa FcRH5. En una forma de realización adicional, la célula localizada selectivamente es una célula cancerosa en la que la expresión de FcRH5 está aumentada en comparación con una célula no cancerosa normal del mismo tipo de tejido. En una forma de realización, un método de la invención causa la muerte de una célula localizada selectivamente.

En otros aspectos de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descriptos en la presente. También se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector. A modo de ejemplo, las células huésped puede ser células CHO, células de E. coli, o células de levaduras. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descriptos en la presente y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

En otro aspecto adicional, la invención trata de una composición de materia que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 descripto en la presente, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se dirige al uso de un polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5 que se describe en la presente,

para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una afección que responde al polipéptido del anticuerpo anti–FcRH5.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una mezcla de los compuestos de anticuerpo–fármaco de Fórmula I donde la carga de fármaco promedio para el anticuerpo es aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que incluye un compuesto ADC de Fórmula I, una mezcla de compuestos ADC de Fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de estos, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

Otro aspecto es un método para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas que comprende tratar células con una cantidad de un conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I, o sal o solvato farmacéuticamente aceptable de esto, que son efectivos para destruir o inhibir la proliferación de las células tumorales o células cancerosas.

Otro aspecto es un método de tratar cáncer que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de a composición farmacéutica que incluye un ADC de Fórmula I.

Otro aspecto incluye artículos de manufactura, es decir kits, que comprenden el conjugado de anticuerpo y fármaco, un recipiente, y un prospecto o rótulo que indica un tratamiento.

Un aspecto de la invención es un método para obtener un compuesto del conjugado de anticuerpo y fármaco de Fórmula I que comprende las etapas de: (a) reacción de un grupo de cisteína manipulado genéticamente del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un reactivo ligador para formar el intermediario anticuerpo-

ligador Ab–L; y (b) reacción de Ab–L con un residuo de fármaco activado D; por la cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco; o que comprende las etapas de: (c) reacción de un grupo nucleofílico de un residuo de fármaco con un reactivo ligador para formar un intermediario fármaco-ligador D–L; y (d) reacción de D–L con un grupo de cisteína manipulado genéticamente del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína; ; por la cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco.

Un aspecto de la invención es un ensayo para detectar células cancerosas que comprende: (a) exponer las células a un conjugado del anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína y fármaco; y (b) determinar el grado de unión del conjugado del anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína y fármaco a las células.

A. Anticuerpos anti–FcRH5

En una forma de realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti–FcRH5 que se pueden utilizar en la presente como agentes terapéuticos. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se originan con preferencia en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser de utilidad conjugar el antígeno relevante para una proteína que es inmunogénica en las especies inmunizadas. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a hemocianina de lapa californiana (KH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$,

o $R_1N=C=NR$, donde R y R_1 son independientemente grupos alquilo inferior.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados por la combinación, por ejemplo, de 100 µg o 5 µg de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante de Freund completo y la inyección de la solución en forma intradérmica en múltiples sitios. Un mes después a los animales se les aplica un refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en el adyuvante de Freund completo por la inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 después se extrae sangre a los animales y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Se aplica refuerzo a los animales hasta que el título llega a la meseta. Los conjugados también se obtienen en un cultivo de células recombinantes como fusiones de proteína. Asimismo, los agentes de agregación tales como alúmina son adecuados para mejorar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el método del hibridoma descripto primero por Kohler *et al., Nature,* 256:495 (1975), o se puede preparar por métodos de ADN recombinante (patente US No 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente en la presente para estimular linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. En forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y luego se fusionan con una línea de células de mieloma mediante un agente de fusión adecuada, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Anticuerpos: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células del hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que con preferencia contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas (también denominadas como compañero de fusión). Por ejemplo si las células de mieloma progenitoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirán hipoxantina, aminopterina y timidinata (medio HAT), tales sustancias impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma compañeras de fusión preferidas son las que se fusionan en forma eficiente, sostienen la producción de alto nivel de anticuerpos estable por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio selectivo que selecciona contra las células progenitoras no fusionadas. Las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murinas, tal como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, y las células SP-2 y sus derivados, por ejemplo, X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano han sido descriptas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual crecen las células del hibridoma se ensaya para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antigeno. Con preferencia, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células del hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal

como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar por ejemplo, por el análisis de Scatchard descripto en Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Una vez que se identifican las células del hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución límite y cultivar por métodos estándares (Goding, Monoclonal Anticuerpos: Principles y Practice, pp,59–103 (Academic Press, 1986)). El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo el medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células del hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, liquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos murinos). Las células del hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en las células huésped tales como células de E. coli, células de simio COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de la inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped

recombinantes. La revisión de artículos sobre la expresión recombinante en las bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al., Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

En una forma de realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmento de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos generadas mediante las técnicas descriptas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por transposición génica (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). En consecuencia, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas del hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicional para el aislamiento de anticuerpos monoclonales

El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar, para producir polipéptidos quiméricos o de fusión, por ejemplo, por sustitución de las secuencias del dominio constante (C_H y C_L) de las cadenas pesadas y/o livianas para las secuencias murinas homólogas (patente US No. 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o por la fusión de la secuencia codificadora de inmunoglobulina con total o parte de la secuencia codificadora del polipéptido no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos no inmunoglobulina pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo, o ellos están sustituidos en los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación del antígeno

que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti–FcRH5 de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tal como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan con residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos una y típicamente dos dominios variables, en el cual todos o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de no inmunoglobulina y todos o sustancialmente todos las regiones FR son los de la secuencia de inmunoglobulina de consenso humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá por lo menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al., Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332: 323-329 (1988) y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno

o más residuos de aminoácidos introducidos en este proveniente de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan como residuos de "importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se pueden realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones *et al., Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al., Science* 239:1534-1536 (1988), por la sustitución de las CDR o secuencias de CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense No. 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR con residuos provenientes de sitios análogos en anticuerpos de roedores

La elección de los dominios variables humanos, tanto pesado como liviano, que se usan para obtener los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad y respuesta de HAMA (anticuerpos anti–ratón humano) cuando el anticuerpo está destinado a uso terapéutico humano. La reducción o eliminación de una respuesta HAMA es un aspecto significativo del desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Ver, por ejemplo, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cáncer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cáncer Res. (1990), 50:1495. Como se describe en la presente, la invención proporciona anticuerpos que son humanizados de modo tal que reduzcan o eliminen la respuesta HAMA.

Las variantes de estos anticuerpos se pueden obtener usando métodos de rutina conocidos en la técnica, algunos de los cuales también se describen a continuación. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza frente a la biblioteca completa de las secuencias conocidas del dominio variable humano. Se identifica la secuencia del dominio V humano que está más próxima a la de roedor y la región estructural humana (FR) dentro de esta aceptada por el anticuerpo humanizado. Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadena liviana o pesada particular. La misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se describe en la presente puede servir como secuencia inicial (original) para la diversificación de las secuencias estructurales y/o hipervariables. Una secuencia estructural seleccionada a la que se une una secuencia hipervariable inicial se denomina en la presente como una estructura humana aceptora. Si bien las estructuras humanas aceptoras pueden ser de o derivadas de una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de esta), con preferencia las estructuras humanas aceptoras son o derivan de una secuencia estructural de consenso humana ya que tales estructuras han demostrado tener una inmunogenicidad mínima o ninguna en los pacientes humanos.

Cuando el aceptor deriva de una inmunoglobulina humana, opcionalmente se puede seleccionar una secuencia estructural humana que se selecciona sobre la base de su homología con la secuencia estructural dadora por el alineamiento de la secuencia estructural dadora con varias secuencias estructurales humanas en una colección de

secuencias estructurales humanas, y seleccionar la secuencia estructural más homóloga que la aceptora.

En una forma de realización, estructuras de consenso humanas en la presente son o derivan de secuencias estructurales de consenso del subgrupo III de VH y/o subgrupo I de VL kappa.

Si bien la aceptora puede ser idéntica en secuencia a la secuencia estructural humana seleccionada, sea que provenga de una inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana, la presente invención contempla que la secuencia aceptora puede comprender sustituciones de aminoácidos preexistentes respecto de la secuencia de la inmunoglobulina humana o secuencia estructural de consenso humana. Esta sustituciones preexistentes con preferencia son mínimas; usualmente solo cuatro, tres, dos o una diferencias de aminoácidos respecto de la secuencia de la inmunoglobulina humana o secuencia estructural de consenso.

Los residuos de la región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan en las estructuras humanas aceptoras VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos de CDR de Kabat, los residuos del bucle hipervariable de Chotia, los residuos Abm y/o los residuos por contacto. Opcionalmente, se incorporan siguientes residuos de la región hipervariable extendida: 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3), 26–35B (H1), 50–65, 47–65 o 49–65 (H2) y 93–102, 94–102, o 95–102 (H3).

Si bien la "incorporación" de los residuos de la región hipervariable se describe en la presente, se apreciará que esto se puede obtener de varias maneras, por ejemplo, se puede generar un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada por mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio variable de ratón de modo que los residuos estructurales de este se cambiar por los residuos de la estructura humana aceptora, o por mutación del ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio variable humano de modo que los

residuos del dominio hipervariable se cambian por residuos no humanos, o por la síntesis de ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

En los ejemplos en la presente, las variantes injertadas con región hipervariable se generaron por mutagénesis de Kunkel del ácido nucleico que codifica las secuencias aceptoras humanas, usando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel *et al., Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Se pueden introducir cambios apropiados dentro de la estructura y/o región hipervariable usando técnicas de rutina, para corregir y restablecer las interacciones región hipervariable-antígeno apropiadas.

El despliegue en fago/fagémido (también mencionado en la presente como despliegue en fagos en algunos contextos) se puede usar como un método conveniente y rápido para generar e identificar muchas variantes de anticuerpos potenciales diferentes en una biblioteca generada por aleatorización de secuencias. No obstante, los expertos en el arte disponen de otros métodos para obtener y detectar anticuerpos alterados.

La tecnología de despliegue en fago/fagémido ha provisto una herramienta poderosa para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen a un ligando, tal como un antígeno. El uso de las técnicas de despliegue en fago/fagémido permite la generación de bibliotecas grandes de variantes de proteína que se pueden clasificar rápidamente en las secuencias que se unen a una molécula blanco con afinidad alta. Los ácidos nucleicos que codifican variantes de polipéptidos se fusionan generalmente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de la cubierta viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de despliegue en fagémido monovalente donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una porción la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins,* 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in*

Enzymology, 3:205 (1991)). En un sistema de despliegue en fagémido monovalente, la fusión del gen se expresa a niveles bajos y las proteínas del gen tipo salvaje III también se expresa de modo que se retiene la infectividad de las partículas. Los métodos de generar bibliotecas de péptidos y seleccionar estas bibliotecas se han descripto en muchas patentes (por ejemplo patente US No. 5.723.286, patente US No. 5.432.018, patente US No. 5.580.717, patente US No. 5.427.908 y patente US No. 5.498.530).

Las bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión al antígeno se han preparado de numerosas maneras que incluyen alterar un gen único por la inserción de secuencias de ADN aleatorias o por la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos para desplegar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno usando el despliegue en fago/fagémido se han descripto en las patentes US Nos. 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717, y 5.658.727. La biblioteca luego se analiza para detectar la expresión de anticuerpos o proteínas de unión al antígeno con las características deseadas.

Los métodos de sustituir un aminoácido de elección en un templado de ácido nucleico están bien establecidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la presente. Por ejemplo, los residuos de la región hipervariable se pueden sustituir usando el método de Kunkel. Ver, *por ejemplo,* Kunkel *et al., Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

La secuencia de oligonucleótidos incluye una o más de los conjuntos de codones diseñados para los residuos de la región hipervariable que serán alterados. Un conjunto codónico es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usados para codificar las variantes de aminoácidos deseadas. Los conjuntos codónicos se pueden representar usando símbolos para designar los nucleótidos particulares o las mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra a continuación de acuerdo con el código IUB.

CÓDIGOS IUB

G Guanina

A Adenina

T Timina

C Citosina

R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

H (A o C o T)

B (C o G o T)

V (A o C o G)

D (A o G o T) H

N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto codónico DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto codónico puede presentar 18 codones diferentes y pueden codificar aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gli, y Cys.

Los conjuntos de oligonucleótidos o cebadores se pueden sintetizar usando métodos estándares. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, por la síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos provistos por el conjunto codónico y que codificará el grupo de aminoácidos deseados. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de los nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones es bien conocida en la técnica. Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen determinados conjuntos codónicos se pueden sintetizar usando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponible en por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se puede obtener en el comercio

(por ejemplo, en Life Technologies, Rockville, MD). En consecuencia, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tiene un conjunto codónico particular normalmente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferencias establecidas por el conjunto codónico dentro de la secuencia total. Los oligonucleótidos, que se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a un templado del ácido nucleico del dominio variable y también pueden incluir sitios de enzima de restricción para fines de clonación.

En un método, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de aminoácidos se pueden crear por mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en el arte como se describe en Zoller *et al. Nucleic acids Res.* 10:6487-6504(1987). En breves palabras, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de aminoácidos se crean por la hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifica los conjuntos codónicos con un templado de ADN, donde el templado es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia del templado del ácido nucleico de la región variable. Después de la hibridación, se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria del templado así se incorporará al cebador de de oligonucleótido, y contendrá los conjuntos codónicos provistos por el conjunto de oligonucleótidos.

Generalmente, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al templado en cualquier lado de los nucleótidos que codifican las mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido se hibridará apropiadamente con la molécula del templado de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en el arte tal como se describe en Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

El templado de ADN se genera con los vectores que derivan tanto de los vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles en el comercio son adecuados), como de los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario que se describe en Viera *et al.*, *Met. Enzymol.*, 153:3 (1987). En consecuencia, el ADN que se muta se puede insertar en uno de estos vectores a fin de generar un templado monocatenario. La producción del templado monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, más arriba.

Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida al templado monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Una enzima de polimerización de ADN, usualmente ADN polimerasa T7 o los fragmentos de Klenow de ADN polimerasa I, luego se añade para sintetizar la cadena complementaria del templado usando el oligonucleótido como un cebador de la sintaxis. Así se forma una molécula heteroduplex de modo que una cadena del ADN codifica la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el templado original) codifica la secuencia nativa, no alterada del gen 1. Esta molécula heteroduplex luego se transforma en una célula huésped adecuada, usualmente una procariota tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, se incuban en placas de agarosa y se analizan usando el cebador de oligonucleótido radiomarcado con ^{32}-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

El método descripto inmediatamente antes se puede modificar de modo de crear una molécula homoduplex donde ambas cadenas del plásmido contienen la mutación. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido monocatenario se aparea al templado monocatenario como se describió anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP), y desoxirribotimidina (dTT), se combina con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (que se puede

obtener en Amersham). Esta mezcla se añade al complejo templado-oligonucleótido. Después de la adición de la ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al templado excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en vez de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión con endonucleasa de restricción. Después de que la cadena del templado del heteroduplex bicatenario se corta con una enzima de restricción apropiada, la cadena del templado se puede digerir con ExoIII nucleasa u otra nucleasa apropiada para cortar una región diferente de la que contiene el sitio mutagenizado. La reacción luego se detiene para dejar una molécula que sea solo parcialmente monocatenaria. Un homoduplex de ADN bicatenario completo se forma luego usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido, ATP, y ADN ligasa. Esta molécula homoduplex luego se puede transformar en una célula huésped adecuada.

Como se indicó previamente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de longitud suficiente para hibridarse al templado de ácido nucleico y también puede, pero no necesariamente, contener sitios de restricción. El templado de ADN se puede generar con los vectores que derivan tanto de los vectores del bacteriófago M13, como de los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario que se describe en Viera *et al. Met. Enzymol.*, 153:3 (1987). En consecuencia, el ADN que se muta se puede insertar en uno de estos vectores a fin de generar un templado monocatenario. La producción del templado monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, *supra.*

De acuerdo con otro método, la unión al antígeno se puede restaurar durante la humanización de los anticuerpos mediante la selección de las regiones hipervariables reparadas (Ver Solicitud No. 11/061.841, presentada el 18 de febrero de 2005). El método incluye incorporar las regiones hipervariables no humanas en la estructura

aceptora y además introducir una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables sin modificar la secuencia estructural aceptora. Alternativamente, la introducción de uno o más sustituciones de aminoácidos se puede acompañar con las modificaciones de la secuencia estructural aceptora.

De acuerdo con otro método, una biblioteca se puede generar por la provisión de conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, cada conjunto que tiene una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferentes secuencias establecidas por los conjuntos codónicos provistos dentro de las secuencias de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, junto con una secuencia de ácidos nucleicos del dominio variable del templado, se pueden usar en una reacción en cadena de polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR se pueden denominar como "casetes de ácido nucleico", ya que ellos se fusionan con otras secuencias de ácidos nucleicos relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de cubierta viral y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.

La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos codónicos diseñados para las posiciones accesibles al solvente y altamente diversas de una región hipervariable. Como se describió antes, un conjunto codónico es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usados para codificar variantes de aminoácidos deseadas.

Los selectores de anticuerpos que cumplen los criterios deseados, seleccionados mediante etapas de detección/selección apropiadas se pueden aislar y clonar usando técnicas recombinantes estándares.

Además en general es importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para obtener este objetivo, de acuerdo

con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se dispone de programas de computación que ilustran y despliegan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de semejanza de roles de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *es decir*, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor e importar las secuencias de modo de obtener las características del anticuerpo deseado, tal como aumento de afinidad para los antígenos blanco. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados para influir en la unión al antígeno.

Varias formas de anticuerpo anti–FcRH5 humanizados están contempladas. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como una Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos a fin de generar un inmunoconjugado. En forma alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, después de la inmunización de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descripto que la supresión homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones

mutantes quiméricos y de línea germinal produce una inhibición completa de la producción de anticuerpos monoclonales. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal originará la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo con el antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); patente US Nos. 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y WO 97/17852.

En forma alternativa, la tecnología de despliegue en fagos (McCafferty et al., Nature 348:552–553 [1990]) se puede usar para producir anticuerpos y fragmento de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios del gen del dominio variable (V) de la inmunoglobulina a partir de dadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe estas propiedades. En consecuencia, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. El despliegue en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, revisados en, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Curr. Opin Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos del gen V se pueden usar para el despliegue en fagos. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de dadores humanos no inmunizados y pueden aislar los anticuerpos en una matriz

diversa de antígenos (que incluyen autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descriptas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581–597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12:725–734 (1993). Ver también, patente US. Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar por in vitro por las células B activadas (ver patente US Nos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias es ventajoso usar los fragmentos de anticuerpos, más que los anticuerpos completos. Los fragmentos de menor tamaño permiten una depuración rápida, y pueden llevar a un mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de la digestión proteolítica de los anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992), y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo estos fragmentos en la actualidad se pueden producir directamente por células huésped recombinante. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv se pueden expresar y secretar a partir de *E. coli*, de este modo permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descriptas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)).). De acuerdo con otro método, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente de un cultivo de la célula huésped recombinante. Fab y $F(ab')_2$ con aumento de la vida media El fragmento Fab y $F(ab')_2$ con aumento de la vida media in vivo que comprende los residuos del epitope de unión al receptor de reciclaje se describen en la patente estadounidense No. 5.869.046. Otras

técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el profesional experto. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 93/16185; patente US No. 5.571.894 y patente US No. 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; de este modo, estos pueden ser adecuados para reducir la unión no específica durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión a scFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en los extremos amino o carboxi terminal de un scFv. Ver *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento del anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, como se describe, por ejemplo en la patente US No. 5.641.870. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epitopes diferentes. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epitopes diferentes de una proteína de FcRH5 descripta en la presente. Otros de estos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión FcRH5 con un sitio de unión para otra proteína. En forma alternativa, una rama anti–FcRH5 se puede con una rama que se una a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula del receptor de las células T (*por ejemplo*, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR) tal como FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa FcRH5. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan el FcRH5. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al FcRH5.y un brazo que se une a un agente citotóxico, (*por ejemplo*, saporina, anti-interferón-α, alcaloides de vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con isótopo radiactivo). Los

anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti–ErbB2/anti–FcγRIII y la Patente U.S. No. 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti–ErbB2/anti–FcγRI. Un anticuerpo biespecífico anti–ErbB2/Fcα se muestra en WO98/02463. La Patente U.S. No. 5.821.337 y 6.407.213 describen anticuerpos biespecíficos anti–ErbB2/anti–CD3. También se han descripto anticuerpos biespecíficos adicionales que unen un epitope del antígeno CD3 y un segundo antígeno. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5.078.998 (antígeno anti–CD3/célula tumoral); 5.601.819 (anti–CD3/IL–2R; anti–CD3/CD28; anti–CD3/CD45); 6,129,914 (anti–CD3/antígeno de célula B maligna); 7.112.324 (anti–CD3/CD19); 6.723.538 (anti–CD3/CCR5); 7.235.641 (anti–CD3/EpCAM); 7.262.276 (anti–CD3/antígeno de tumor ovárico); y 5.731.168 (anti–CD3/CD4IgG).

Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada -cadena liviana de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesada y liviana de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que usualmente se realiza con etapas de cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en WO 93/08829 y en Traunecker *et al., EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un método diferente, los dominios variables del anticuerpo se fusionan la especificidad de unión deseada (sitio de

combinación del anticuerpo-antígeno) a las secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. Con preferencia, la fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de la cadena pesada de la Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena liviana, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de la inmunoglobulina se insertan en los vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las formas de realización cuando se usan relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos en la construcción proveen rendimientos óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produce altos rendimientos o cuando las relaciones no son de significación particular.

En una forma de realización preferida de este método, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama y un par de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina híbrida que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se halló que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado proveniente de las combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena liviana de la inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este método se describe en WO 94/04690. Para mayores detalles de la generación de

anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al., Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro método descripto en la Patente U.S, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede manipular genéticamente para maximizar el porcentaje de los heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (*por ejemplo*, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar para las cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales de aminoácidos mayores con las más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero respecto de otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Los anticuerpos biespecíficos producido de acuerdo con este método se denominan en la presente como anticuerpos "protuberancia dentro de la cavidad".

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigirse a las células del sistema inmune a las células no deseadas (Patente U.S: No. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección con HIV (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener usando cualquier medio de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente U.S 4.676.980, junto con numerosas técnicas de entrecruzamiento.

También se han descripto técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando ligamiento químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos de Fab' generados luego se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB luego se reconvierte a Fab'-tiol por la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos de Fab'-SH de *E. coli,* que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al., J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de la molécula de $F(ab')_2$ del anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó en forma separada de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unir las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra los blancos del tumor de mama humano.

También se han descripto varias técnicas para obtener y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cierres de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cierre de leucina provenientes de las proteínas

Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidan para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descripta por Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90:6444-6448 (1993) ha provisto un mecanismo alternativo para obtener fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) por un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, de este modo se forman dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado otra estrategia para obtener fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes por el uso de dímeros de cadena única Fv (sFv). Ver Gruber *et al., J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos en forma covalente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigirse a las células del sistema inmune a las células no deseadas (U.S.P. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección con VIH (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Está contemplado que los anticuerpos se pueden preparar in vitro usando métodos conocidos en química de síntesis de proteínas, que incluyen los que involucran agentes de

entrecruzamientos. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o por la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los que se describen, por ejemplo, en la patente US No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede incorporar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión de antígeno (*por ejemplo*, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente por la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al amino-terminal del antígeno a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente comprende (o consiste) tres a aproximadamente ocho, pero con preferencia cuatro sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y con preferencia dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena polipeptídica(s) comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena polipeptídica puede comprender VD1-$(X1)_n$ -VD2-$(X2)_n$ -Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena polipeptídica(s) puede comprender: cadena de Fc de la región VH-CH1-ligador VH-CH1-flexible; o la cadena Fc de la región VH-CH1-VH-CH1. El anticuerpo multivalente de la presente con preferencia además comprende al menos dos (y con

preferencia cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena liviana, El anticuerpo multivalente de la presente, por ejemplo, puede comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena liviana. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena liviana aquí contemplados comprende un dominio variable de cadena liviana y, opcionalmente, además comprenden un dominio CL.

8. Manipulación genética de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora de Fc, *por ejemplo,* de modo de modificar (*por ejemplo*, aumentar o eliminar) citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede obtener por introducir uno o más sustituciones de aminoácidos en una región de Fc del anticuerpo. En forma alternativa o en forma adicional, los residuos de cisteína se pueden introducir en la región de Fc, de este modo se permite la formación de enlaces disulfuro intercatenario en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener mejor capacidad de internalización y/o aumento de la destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Ver Caron *et al.*, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada también se pueden preparar usando entrecruzadotes heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede manipular genéticamente un anticuerpo que tiene regiones de Fc duales y de este modo puede presentar aumento de lisis de complemento y capacidades de ADCC. Ver Stevenson et al Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epitope de unión al receptor de reciclaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), por ejemplo

como se describe en la Patente US 5.739.277. Como se usa en la presente, el término "epitope de unión al receptor de reciclaje" se refiere a un epitope de la región de Fc de una molécula de IgG (*por ejemplo*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, o IgG_4) que es responsable para aumentar la vida media sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados (denominados en forma indistinta "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprende un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibitorio del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, planta o animal o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

En ciertas formas de realización, an inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente (*por ejemplo*, con anterioridad). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de los mismos que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de la toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteína Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantiar, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de los anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan por medio una variedad de agentes de acoplamiento de la proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano

(IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de pequeñas moléculas, tales como una calicheamicina, péptidos de aurostatinas, tales como monometilauristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maytansinoides, tales como DM1, a tricoteceno, y CC1065, y y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina, también están contemplados en la presente.

Ejemplos de inmunoconjugados – conjugados de anticuerpo y fármaco

Un inmunoconjugado (o "conjugado de anticuerpo y fármaco" ("ADC")) de la invención puede ser de la siguiente Fórmula I, en donde un anticuerpo se conjuga (es decir, se une en forma covalente) a uno o más residuos de fármaco (D) a través de un ligador opcional (L). Los ADC pueden incluir conjugados de fármaco y tioMAb ("TDC").

$Ab-(L-D)_p$ I

Por consiguiente, el anticuerpo se puede conjugar al fármaco en forma directa o por medio de un ligador. En la Fórmula I, p es el número promedio de residuos de fármaco por anticuerpo, que puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de fármaco por anticuerpo, y en ciertas formas de realización, de 1 a

aproximadamente 8 residuos de fármaco por anticuerpo. La invención incluye una composición que comprende una mezcla de compuestos de anticuerpo–fármaco de Fórmula I donde la carga de fármaco promedio por anticuerpo es aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

a. Ejemplo de ligadores

Un ligador puede estar compuesto de uno o más componentes del ligador. Los ejemplos de los componentes del ligador incluyen 6-maleimidocaproílo ("MC"), maleimidopropanoílo ("MP"), valina-citrullina ("val-cit"), alanina-fenilalnina ("ala-phe"), p-aminobenziloxicarbonilo ("PAB"), y los que resulten de la conjugación con ligadores del reactivo: pentanoato de N–succinimidil 4–(2–piridiltio) que forma residuo ligador de ácido 4–mercaptopentanoico "SPP"), 4–(N–maleimidometil)ciclohexano–1-carboxilato de N–succinimidilo que forma residuo ligador de ácido (2,5–dioxopirrolidin–1–il)metil)ciclohexanocarboxílico ("SMCC", también denominado en la presente como "MCC"), 4–(piridin–2–ildisulfanil)butanoato de 2,5–dioxopirrolidin–1–ilo que forma residuo ligador de ácido 4–mercaptobutanoico ("SPDB"), (4–yodo–acetil) aminobenzoato de N–succinimidilo ("SIAB"), etilenoxi $-CH_2CH_2O-$ como una o más unidades repetidas ("EO" o "PEO"). Los componentes adicionales del ligador son conocidos en la técnica y algunos se describen en la presente.

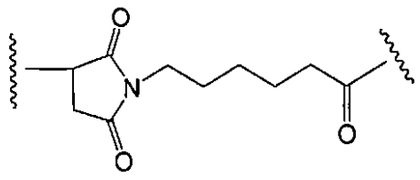
Un ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco en la célula. Por ejemplo, se puede usar un ligador lábil a los ácidos (por ejemplo, hidrazona), ligador sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a proteasa), ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari et al., Cáncer Research 52:127–131 (1992); Patente U.S. No. 5.208.020).

En ciertas formas de realización, un ligador se muestra en la siguiente Fórmula II:

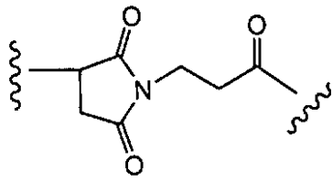
$$—A_a—W_w—Y_y—$$ II

en donde A es una unidad de extensión, y a es un número entero de 0 a 1; W es una unidad de aminoácido, y w es un número entero de 0 a 12; Y es una unidad espaciadora, e y es 0, 1, o 2; y Ab, D, y p se definieron anteriormente para la Fórmula I. Los ejemplos de formas de realización de dichos ligadores se describen en US 2005–0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

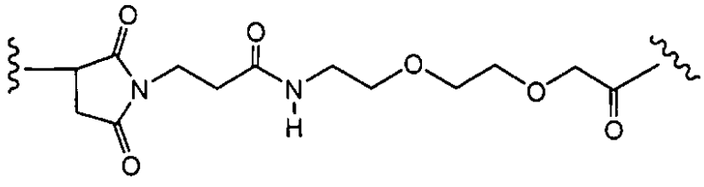
En algunas formas de realización, un componente ligador puede comprender una "unidad de extensión" que liga un anticuerpo a otro componente ligador o a un residuo de fármaco. Los ejemplos de unidades de extensión se muestran a continuación (en donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo):



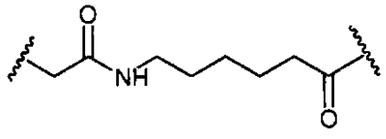
MC



MP



MPEG



En algunas formas de realización, un componente ligador puede comprender una unidad de aminoácido. En una de estas formas de realización, la unidad de aminoácido permite la escisión del ligador por una proteasa, de este modo facilita la liberación del fármaco del inmunoconjugado después de la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas. *Ver, por ejemplo*, Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778–784. Los ejemplos de unidades de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, y un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina–citrulina (vc o val–cit), alanina–fenilalanina (af o ala–phe); fenilalanina–lisina (fk o phe–lys); o N–metil–valina–citrulina (Me–val–cit). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina–valina–citrulina (gly–val–cit) y glicina–glicina–glicina (gly–gly–gly). Una unidad de aminoácido puede comprender residuos de aminoácidos naturales, además de los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Las unidades de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática por enzimas particulares, por ejemplo una proteasa asociada al tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

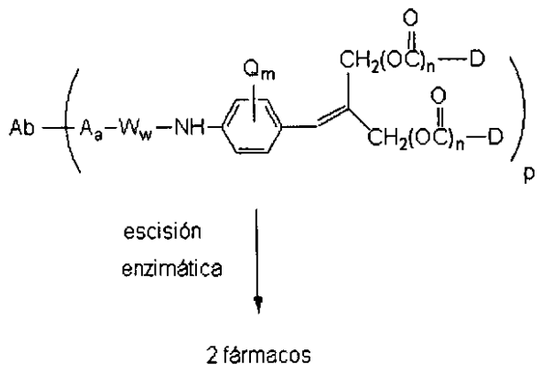
En algunas formas de realización, un componente ligador puede comprender una unidad "espaciadora" que une el anticuerpo a un residuo de fármaco, en forma directa o a modo de una unidad de extensión y/o una unidad de aminoácido. Una unidad espaciadora puede ser "autodestructiva" o "no autodestructiva." Una unidad espaciadora "no autodestructiva" es una en que parte o el total de la unidad espaciadora permanece unida al residuo de fármaco después de la escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Los ejemplos de unidades espaciadores de no autodestructivo incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. Otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptible a la escisión enzimática específica de secuencia también están contempladas. Por ejemplo, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad

espaciadora de glicina–glicina por una proteasas asociada a células tumorales debería producir la liberación del residuo de fármaco de glicina–glicina del resto del ADC. En una de estas formas de realización, el residuo de fármaco de glicina–glicina luego se somete a una etapa de hidrólisis separada en la célula tumoral, de este modo se escinde la unidad espaciadora de glicina–glicina del residuo de fármaco.

Una unidad espaciadora "autodestructiva" permite la liberación del residuo de fármaco sin una etapa separada de hidrólisis. En ciertas formas de realización, una unidad espaciadora de un ligador comprende una unidad de p–aminobencilo. En una de esta formas de realización, un alcohol p–aminobencílico se une a una unidad de aminoácido por medio de un enlace amida, y un carbamato, metilcarbamato, o carbonato se forma entre el alcohol bencílico y un agente citotóxico. *Ver, por ejemplo*, Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087–1103. En una forma de realización, la unidad espaciadora es p–aminobenciloxicarbonilo (PAB). En ciertas formas de realización, la porción fenieleno de una unidad p–aminobencilo está sustituida con Qm, en donde Q es alquilo $–C_1–C_8$, –O–(alquilo $C_1–C_8$), –halógeno, –nitro o –ciano; y m es un número entero que varía de 0–4. Los ejemplos de las unidades espaciadoras autodestructivo también incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares a alcohol p–aminobencílico (*ver, por ejemplo*, US 2005/0256030 A1), tal como derivados de 2–aminoimidazol–5–metanol (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto– o para–aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que experimentan la ciclación después de la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4–aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); sistemas anulares biciclo[2,2,1] y biciclo[2,2,2] apropiadamente sustituidos (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); y amidas del ácido 2–aminoren ilpropiónico(Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). La eliminación de los fármacos que contienen amina que están

sustituidas en la a de glicina (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autodestructivo útiles en los ADC.

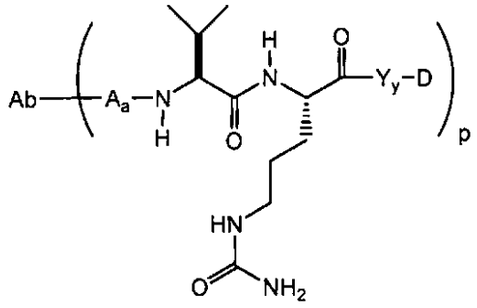
En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno ramificado (BHMS) que se describe a continuación, que se puede usar para incorporar y liberar fármacos múltiples.



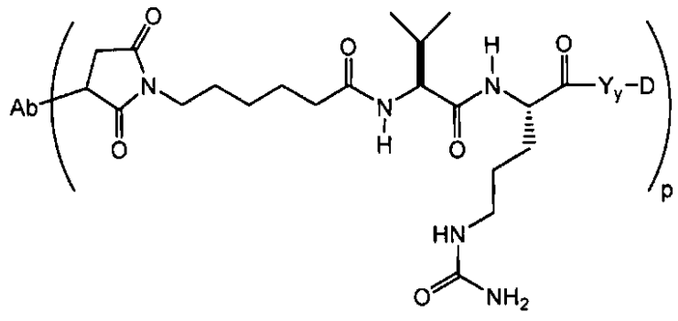
en donde Q es alquilo –C_1–C_8, –O–(alquilo –C_1–C_8), –halógeno, –nitro o –ciano; m es un número entero que varía de 0–4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

En otra forma de realización, el ligador L puede ser un ligador tipo dendrítico para la unión covalente de más de un residuo de fármaco a través de un residuo ligador de ramificación, multifuncional a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213–2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761–1768). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar del fármaco al anticuerpo, es decir, la carga, que se relaciona con la potencia del ADC. En consecuencia, cuando un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína porta solo un grupo reactivo de tiol de la cisteína, una multitud de residuos de fármaco se pueden unir a través de un ligador dendrítico.

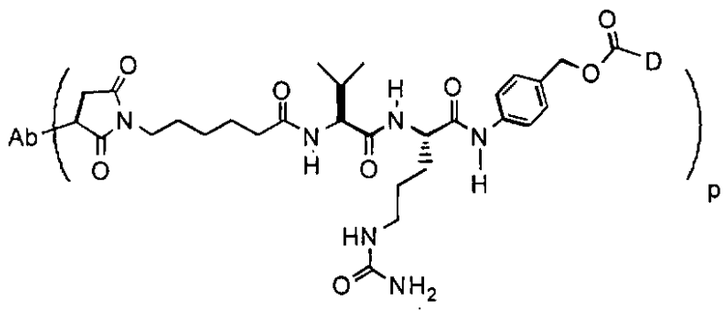
Los ejemplos de componentes ligadores y sus combinaciones se muestran a continuación en el contexto de los ADC de Fórmula II:



Val–Cit o VC



MC–val–cit



MC–val–cit–PAB

Los componentes ligadores que incluyen unidades de extensión, espaciadores y aminoácidos, se pueden sintetizar por métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en 2005–0238649 A1.

b. Ejemplos de residuos de fármaco

(1) Maytansina y maytansinoides

En algunas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugaado a una o más moléculas maytansinoides. Los maytansinoides son inhibidores mitóticos que actúan por inhibición de polimerización de la tubulina. La maytansina se aisló primero del arbusto del este de África Maytenus serrata (Patente U.S No. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maytansinoides, tal como maytansinol y ésteres de maytansinol C-3 (Patente U.S No. 4.151.042). Los maytansinol sintéticos y derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo en las Patentes U.S Nos. 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4..260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663, y 4.371.533 .

Los residuos de fármacos maytansinoides son residuos de fármacos atractivos para los conjugados de anticuerpo y fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de los productos de fermentación, (ii) susceptible a derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante los ligadores no disulfuro a los anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) efectivo contra una variedad de líneas celulares tumorales.

Los compuestos de maytansina adecuados para usar como residuos de fármaco maytansinoide son bien conocidos en la técnica y se pueden aislar de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o producidos usando técnicas de ingeniería genética y fermentación (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al (2002) PNAS 99:7968–7973). Maytansinol y los análogos de maytansinol también se pueden preparar en forma sintética de acuerdo con método conocidos.

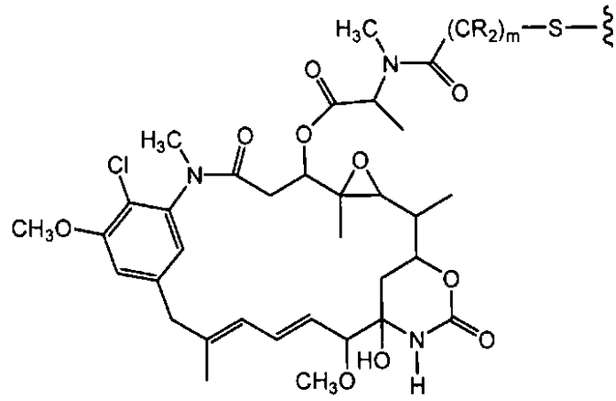
Los ejemplos de residuos de fármaco maytansinoide ocluyen los que tienen un anillo aromático modificado, tal como: C–19–decloro (Patente U.S. No. 4256746) (preparado por la reducción con hidruo de litio

y aluminio de ansamitocina P2); C–20–hidroxi (o C–20–demetil) +/–C–19–decloro (Patente U.S. Nos. 4361650 y 4307016) (preparado por la desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y C–20–demetoxi, C–20–aciloxi (–OCOR), +/–decloro (Patente U.S. No. 4.294757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo) y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

Los ejemplos de residuos de fármaco maytansinoide también incluyen los que tienen modificaciones tales como: C–9–SH (Patente U.S. No. 4424219) (preparado por la reacción de maytansinol con H_2S o P_2S_5); C–14–alcoximetil(demetoxi/CH_2 O)(US 4331598); C–14–hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (Patente U.S. No. 4450254) (preparado en Nocardia); C–15–hidroxi/aciloxi (US 4364866) (preparado por la conversión de maytansinol por Streptomyces); C–15–metoxi (Patentes U.S. Nos. 4313946 y 4315929) (aislados de Trewia nudlflora); C–18–N–desmetilo (Patented U.S. Nos. 4362663 y 4322348) (preparado por la desmetilación de maytansinol por Streptomyces); y 4,5–desoxi (US 4371533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maytansinol).

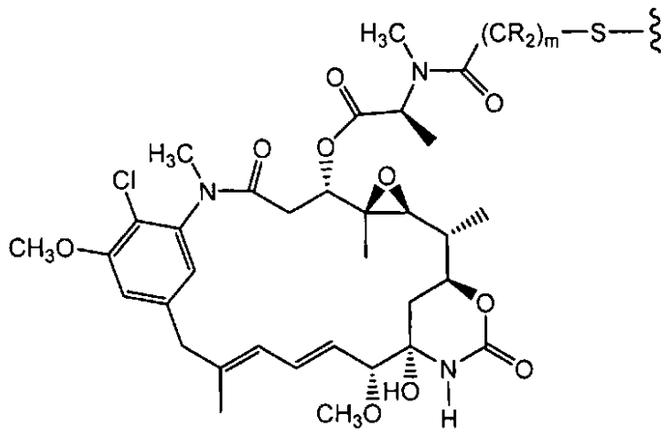
Se sabe que muchas posiciones de los compuestos de maytansina son útiles como posición de ligadura, de acuerdo con el tipo de ligadura. Por ejemplo, para formar una ligadura éster, la posición C–3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C–14 modificada con hidroximetilo, la posición C–15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C–20 que tiene un grupo hidroxilo son todas adecuadas (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

Los residuos de fármaco maytansinoides incluyen los que tienen la estructura:

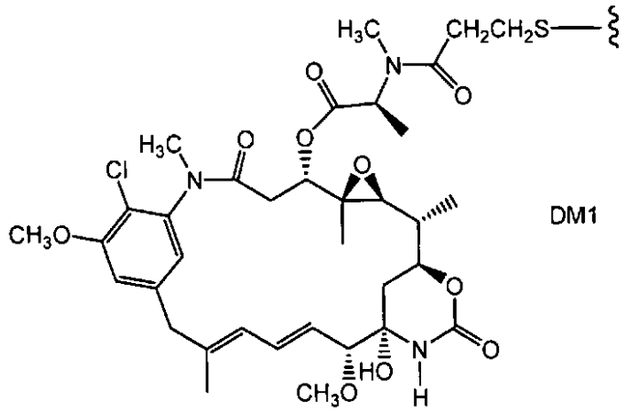


donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del residuo de fármaco maytansinoide a un ligador de un ADC. R puede ser de modo independiente H o un alquilo C_1–C_6. La cadena alquileno que une el grupo amida al átomo de azufre puede sere metanilo, etanilo, o propilo, es decir, m es 1, 2, o 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al (1992) *Cáncer Res.* 52:127–131; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618–8623).

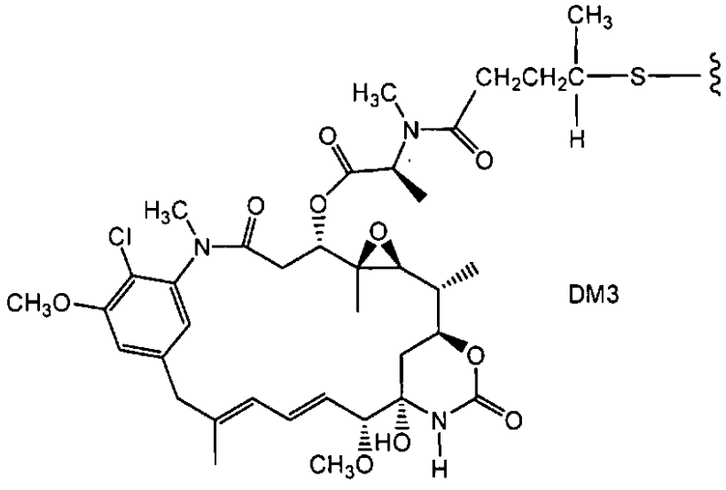
Todos los estereoisómeros del residuo de fármaco maytansinoide están contemplados por los compuestos de la invención, es decir, cualquier combinación de configuraciones *R* y *S* en los carbonos quirales de D. En una forma de realización, el residuo de fármaco maytansinoide tendrá la siguiente estereoquímica:



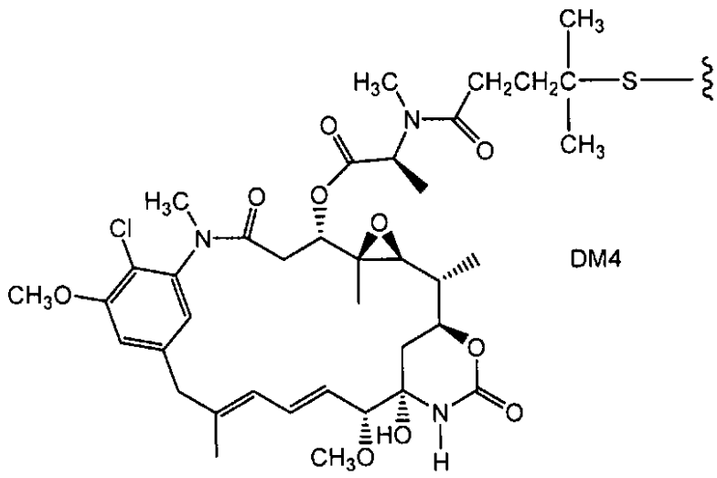
Los ejemplos de formas de realización de residuos de fármaco maytansinoides incluyen: DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:



DM1



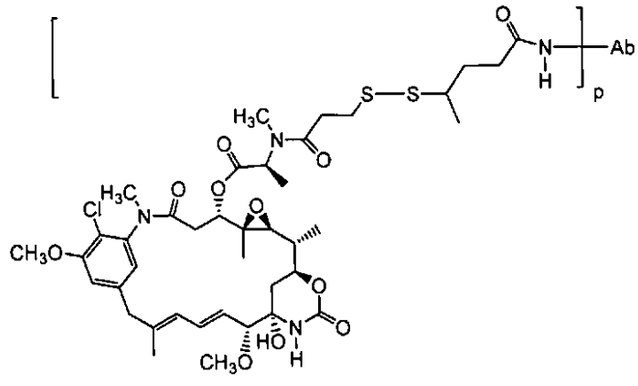
DM3



DM4

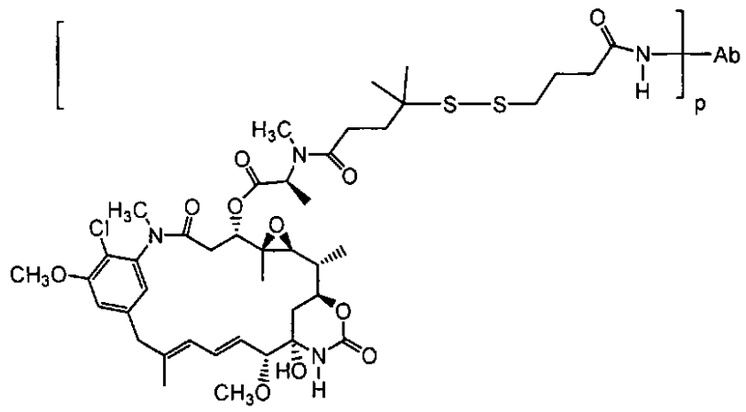
en donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco a un ligador (L) del conjugado de anticuerpo y fármaco. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

Otros ejemplos de conjugados de anticuerpo y fármaco maytansinoide tienen las siguientes estructuras y abreviaturas, (en donde Ab es anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):

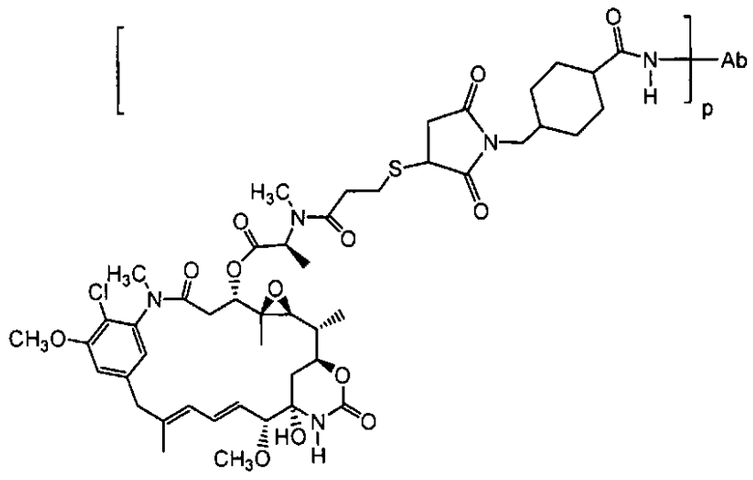


DM1

Ab –SPP–



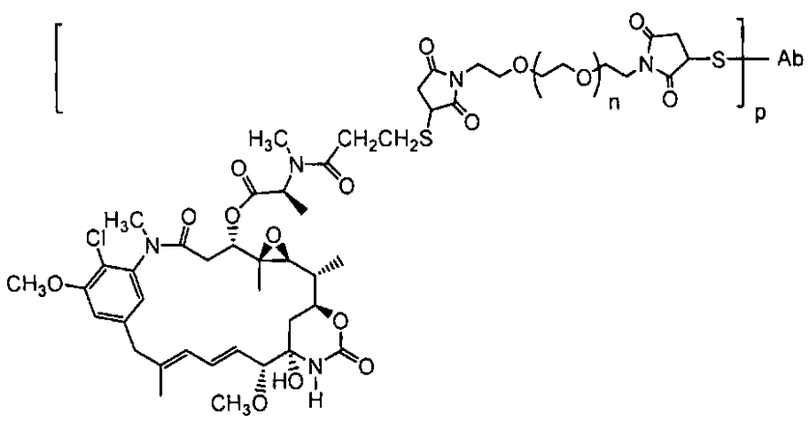
Ab–SPDB–DM4



Ab–SMCC–DM1

En una forma de realización, El conjugado de anticuerpo y fármaco se forma cuando DM4 se une a través de un ligador SPDB a un grupo tiol del anticuerpo (ver Patentes U.S. Nos. 6913748 y 7276497, cuyos contenidos completos se incorporan por referencia en la presente).

Los ejemplos de conjugados de anticuerpo y fármaco donde DM1 se une a través un ligador BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



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

Los inmunoconjugados que contienen maytansinoides, los métodos de obtenerlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en Erickson, et al (2006) Cáncer Res. 66(8):4426–4433; Patentes U.S. Nos. 5.208.020, 5.416.064, US 2005/0276812 A1, y Patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas descripciones se incorporan expresamente por la presente como referencia. Los conjugados de anticuerpo–maytansinoide se preparan por unión química de un anticuerpo a la molécula maytansinoide sin disminución significativa de la actividad biológica del anticuerpo o la molécula del maytansinoide. Ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.208.020 (cuya descripción se incorpora expresamente en la presente como referencia). Los maytansinoides se pueden sintetizar por técnicas conocidas o aisladas de fuentes naturales. Los maytansinoides adecuados se describen, por ejemplo en la Patente Estadounidense No. 5.208,020 y en las otras publicaciones de patentes y no patentes mencionadas anteriormente en la presente, tales como maytansinol y análogos de maytansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la moléculas de maytansinol, tal como diversos ésteres de maytansinol.

Estos son grupos de unión conocidos en la técnica para la preparación de conjugados del anticuerpo-maytansinoide, que incluyen, por ejemplo a los descriptos en la Patente Estadounidense No. 5.208.020

o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), y US 2005/016993 A1, cuyas descripciones se incorporan expresamente en la presente como referencia. Los conjugados de anticuerpo-maytansinoide que comprende el componente ligador SMCC se puede preparar como se describe en 2005/0276812 A1. "Antibody-drug conjugates and Methods." Los ligadores comprenden grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos de ácidos lábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente. Los grupos de unión adicionales se describen y ejemplifican en la presente.

Los conjugados del anticuerpo y maytansinoide se pueden preparan mediante una variedad de agentes de acoplamiento de una proteína bifuncional 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 adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bisactivo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). En ciertas formas de realización, el agente es N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) o N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar una unión de disulfuro.

El ligador se puede unir a la molécula maytansinoide en varias posiciones, que dependen del tipo de unión. Por ejemplo una unión éster se puede formar por la reacción con un grupo hidroxilo mediante técnicas de acoplamiento convencional. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la

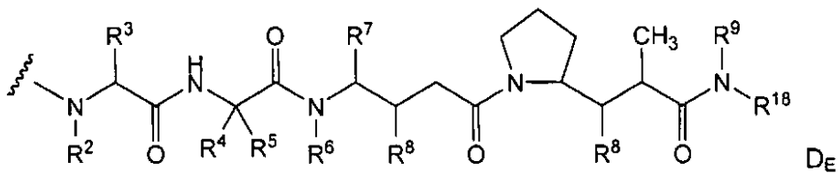
posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una forma de realización, la unión se forma en la posición C-3 del maytansinol o un análogo de maytansinol.

(2) Auristatinas y dolastatinas

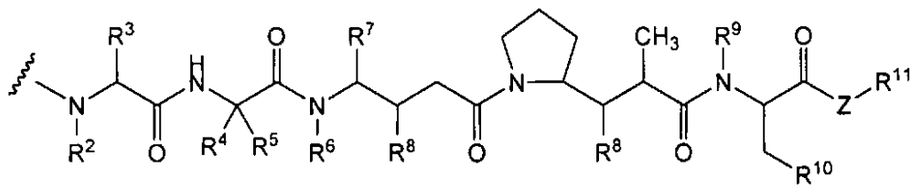
En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastatinas o análogos peptídico de dolostatina y derivados, las auristatinas (Patentes U.S Nos. 5.635.483, 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticáncer (US 5.663.149) y antifúngica (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El residuo del fármaco de dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo mediante el extremo terminal del N (amino) o C (carboxilo) del residuo del fármaco peptídico (WO 02/088172).

Los ejemplos de las formas de realización de auristatina incluyen los residuos del fármaco monometilauristatina ligado al extremo N-terminal DE y DF (US 2005/0238649, descripto en Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presentado el 28 de marzo de 2004, cuya descripción se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia en su totalidad).

Un residuo de fármaco peptídico se puede seleccionar de las siguientes Fórmulas D_E y D_F:



D_E



D_F

en donde la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente del anticuerpo–ligador, y se unen de modo independiente en cada ubicación:

R^2 se selecciona de H y alquilo C_1–C_8;

R^3 se selecciona de H, alquilo C_1–C_8, carbociclo C_3–C_8, arilo, alquil C_1–C_8–arilo, alquil C_1–C_8–(carbociclo C_3–C_8), heterociclo C_3–C_8 y alquilo C_1–C_8–(heterociclo C_3–C_8);

R^4 se selecciona de H, alquilo C_1–C_8, carbociclo C_3–C_8, arilo, alquil C_1–C_8–arilo, alquil C_1–C_8–(carbociclo C_3–C_8), heterociclo C_3–C_8 y alquil C_1–C_8–(heterociclo C_3–C_8);

R^5 se selecciona de H y metilo;

o R^4 y R^5 forman en conjunto un anillo carbocíclico y tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en donde R^a y R^b se seleccionan de modo independiente de H, alquilo C_1–C_8 y carbociclo C_3–C_8 y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona de H y alquilo C_1–C_8;

R^7 se selecciona de H, alquilo C_1–C_8, carbociclo C_3–C_8, arilo, alquil C_1–C_8–arilo, alquil C_1–C_8–(carbociclo C_3–C_8), heterociclo C_3–C_8 y alquil C_1–C_8–(heterociclo C_3–C_8);

each R^8 se selecciona de modo independiente de H, OH, alquilo C_1–C_8, carbociclo C_3–C_8 y O–(alquilo C_1–C_8);

R^9 se selecciona de H y alquilo C_1–C_8;

R^{10} se selecciona de arilo o heterociclo C_3–C_8;

Z es O, S, NH, o NR^{12}, en donde R^{12} es alquilo C_1–C_8;

R^{11} se selecciona de H, alquilo C_1–C_{20}, arilo, heterociclo C_3–C_8, $-(R^{13}O)_m–R^{14}$, o $-(R^{13}O)_m–CH(R^{15})_2$;

m es un número entero que varía de 1–1000;

R^{13} es alquilo C_2–C_8;

R^{14} es H o alquilo C_1–C_8;

cada aparición de R^{15} es de modo independiente H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, o $-(CH_2)_n-SO_3$–alquilo C_1–C_8;

cada aparición de R^{16} es de modo independiente H, alquilo C_1–C_8, o $-(CH_2)_n-COOH$;

R^{18} se selecciona de $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$–arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$–(heterociclo C_3–C_8), y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$–(carbociclo C_3–C_8); y

n es un número entero que varía de 0 to 6.

En una forma de realización, R^3, R^4 y R^7 son de modo independiente isopropilo o sec–butilo y R^5 es –H o metilo. En un ejemplo de forma de realización, R^3 y R^4 son isopropilo, R^5 es –H, y R^7 es sec–butilo.

En aún otra forma de realización, R^2 y R^6 son metilo, y R^9 es –H.

En otra forma de realización más, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$.

En un ejemplo de forma de realización, R^3 y R^4 son isopropilo, R^2 y R^6 son metilo, R^5 es –H, R^7 es sec–butilo, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es –H.

En una forma de realización, Z es –O– o –NH–.

En una forma de realización, R^{10} es arilo.

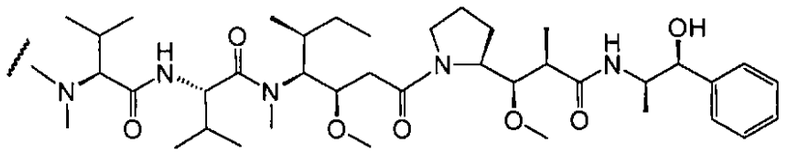
En un ejemplo de forma de realización, R^{10} es –fenilo.

En un ejemplo de forma de realización, cuando Z es –O–, R^{11} es –H, metilo o t–butilo.

En una forma de realización, cuando Z es –NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es –alquilo C_1–C_8 o $-(CH_2)_n-COOH$.

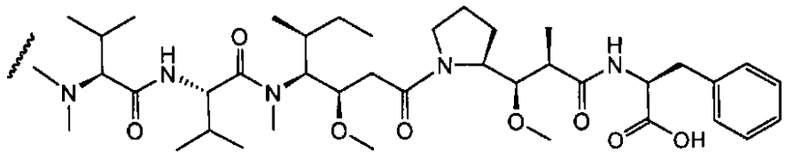
En otra forma de realización, cuando Z es –NH, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en donde R^{15} es $-(CH_2)_n-SO_3H$.

Un ejemplo de forma de realización de auristatina de fórmula D_E es MMAE, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco:



MMAE

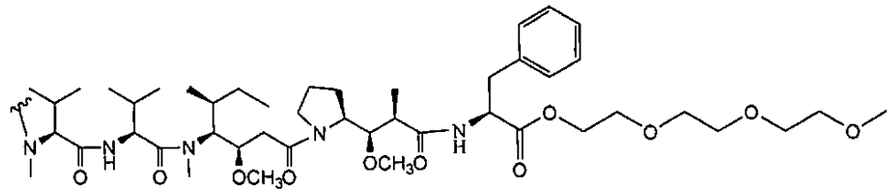
Un ejemplo de forma de realización de auristatina de fórmula D_F es MMAF, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un ligador (L) del conjugado de anticuerpo y fármaco (*ver* US 2005/0238649 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124):

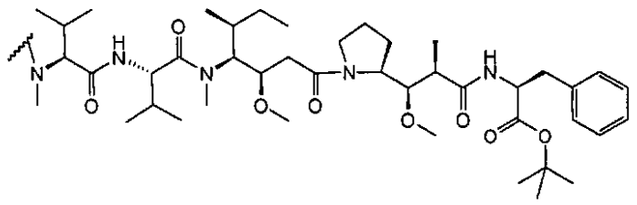


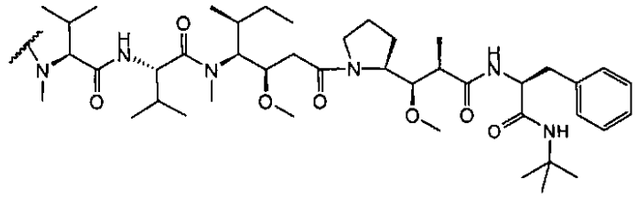
MMAF

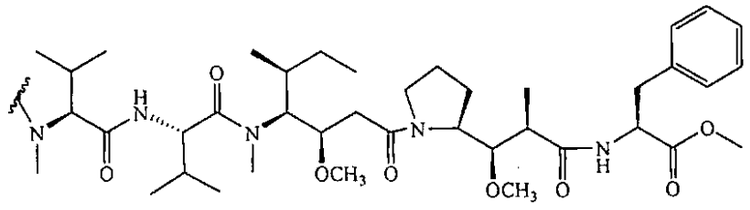
Otros ejemplos de formas de realización incluyen los compuestos de monometilvalina que tienen fenilalanina con modificaciones carboxi en el extremo C–terminal del pentapéptido del residuo de fármaco de auristatina (WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen fenilalanina con modificaciones en la cadena lateral en el extremo C–terminal del pentapéptido del residuo de fármaco de auristatina (WO 2007/008603).

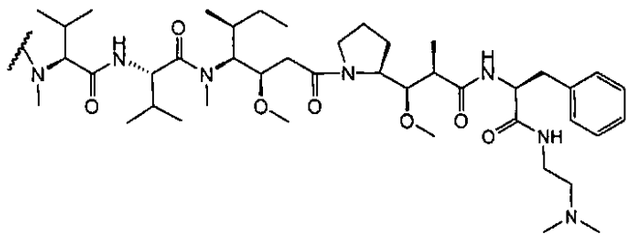
Otros residuos del fármaco incluyen los siguientes derivados de MMAF, en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un ligador (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco:

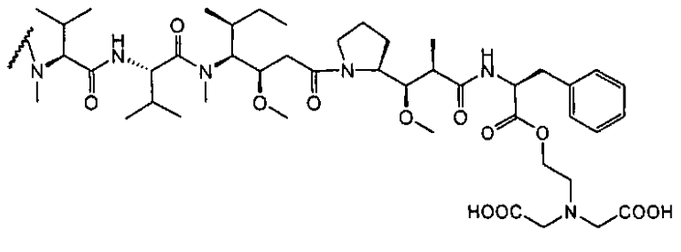


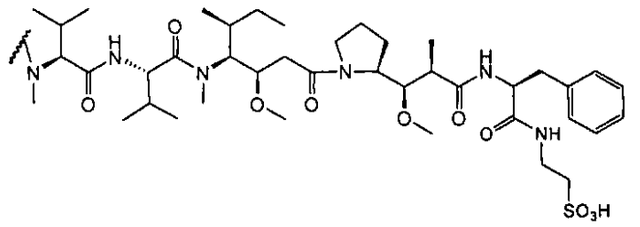


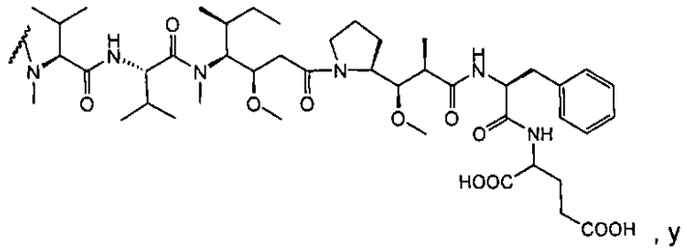


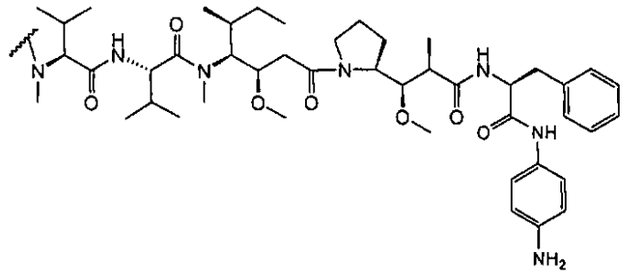








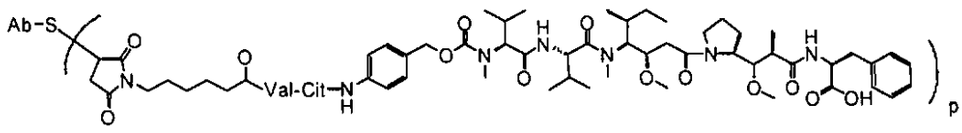




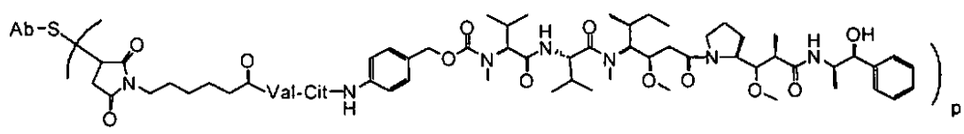
En un aspecto, los grupos hidrofílicos que incluyen pero sin limitación, ésteres de trietilenglicol (TEG), como se mostró anteriormente, se pueden unir al residuo de fármaco en R^{11}. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los grupos hidrofílicos colaborar en la internalización y no aglomeración del residuo de fármaco.

Los ejemplos de formas de realización de ADC de Fórmula I que comprende una auristatina/dolastatina o derivado de estas se describen en US 2005–0238649 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124, que se incorpora expresamente en la presente por referencia. Los ejemplos de formas de realización de los ADC de Fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y varios componentes ligadores tienen las

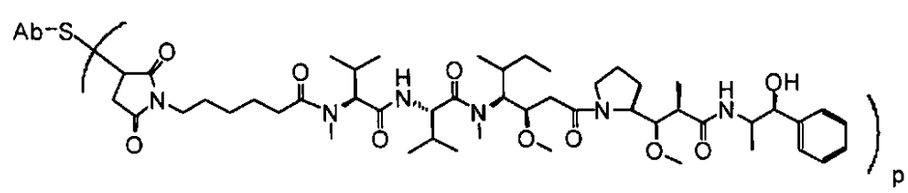
siguientes estructuras y abreviaturas (en donde "Ab" es un anticuerpo; p es 1 a aproximadamente 8, "Val–Cit" o "vc" es un dipéptido de valina–citrulina; y "S" es un átomo de azufre. Se observará que en algunas de las descripciones estructurales de azufre ligada al ADC en la presente el anticuerpo se representa como "Ab–S" solo para indicar la característica del enlace de azufre y no para indicar que un átomo de azufre particular porta múltiples residuos de ligador-fármaco. Los paréntesis de la izquierda de las siguientes estructuras también se pueden colocar a la izquierda del átomo de azufre, entre Ab y S, que sería una descripción equivalente del ADC de la invención descripto en toda la presente.



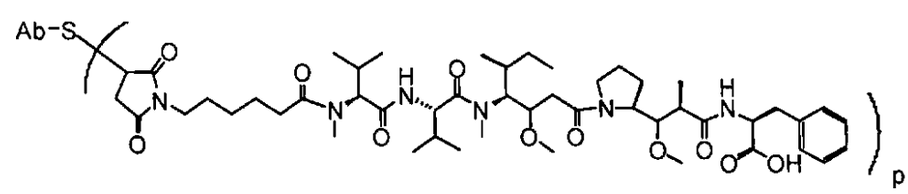
Ab–MC–vc–PAB–MMAF



Ab–MC–vc–PAB–MMAE



Ab–MC–MMAE



Ab–MC–MMAF

Los ejemplos de formas de realización de los ADC de la Fórmula I que comprenden MMAF y varios componentes ligadores además incluyen Ab–MC–PAB–MMAF y Ab–PAB–MMAF. De modo interesante, los inmunoconjugados que comprenden MMAF unidos a un anticuerpo por un ligador que no es proteolíticamente escindible ha demostrado poseer actividad comparable a los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo por un ligador proteolíticamente escindible. *Ver*, Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124. En estos casos, se considera que la liberación del fármaco es efectuada por la degradación del anticuerpo la célula. *Id*

Normalmente, los residuos del fármaco basados en péptidos se pueden preparar por la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos del péptido. Tales enlaces de péptidos se pueden preparar, por ejemplo de acuerdo con el métodos de síntesis en fase líquida (ver E. Schröder y K. Lübke, "The Peptide", volumen 1, paginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los residuos de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: 2005–0238649 A1; Patente U.S. No,5635483; Patente U.S. No 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463–5465; Pettit et al (1998) *Anti–Cáncer Drug Design* 13:243–277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719–725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5:859–863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778–784.

En particular, los residuos de fármaco de auristatina/dolastatina de fórmula D_F, tales como MMAF y sus derivados, se pueden preparar usando métodos descriptos en US 2005–0238649 A1 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114–124. Los de fármaco de auristatina/dolastatina de fórmula D_E, tales como MMAE y sus derivados, se pueden preparar usando métodos descriptos en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778–784. Los residuos de fármaco–ligador MC–MMAF,

MC–MMAE, MC–vc–PAB–MMAF, y MC–vc–PAB–MMAE se pueden sintetizar convenientemente por métodos de rutina, por ejemplo, como se describe en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778–784, y publicación de solicitud de Patente No. US 2005/0238649 A1, y luego se conjuga a un anticuerpo de interés.

(3) Calicheamicina

En otras formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de calicheamicina de antibióticos es capaz de producir rupturas del ADN de doble cadena en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, ver Patentes U:S 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de la American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la calicheamicina que se pueden usar incluyen pero sin limitación a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG y θ^I_1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las Patentes U.S precedentes de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que se puede conjugar al anticuerpo es QFA que es un antifolato. La calicheamicina y QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesa fácilmente la membrana plasmática. Por consiguiente, la capitación celular de estos agentes mediante la internalización mediada por anticuerpos mejora mucho sus efectos citotóxicos.

c. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descripto en las Patentes U.S. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (Patente U.S. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no

unión de la toxina difteria, cadena A de exotoxina (de la Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención además contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como a desoxirribonucleasa, ADNsa).

En ciertas formas de realización, un inmunoconjugado puede comprender un átomo altamente radiactivo. . Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para la detección puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123}, o y una marca del espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida imágenes de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 otra vez, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las marcas radiactivas u otras se pueden incorporar en el inmunoconjugado de maneras conocidas. Por ejemplo el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis química de aminoácidos mediante precursores de aminoácidos adecuados que involucran, por ejemplo flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tales tc^{99m} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} y In^{111} se pueden unir por medio de un residuo de cisteína del péptido. El itrio-90 se puede unir por medio de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res.

Commun. 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Anticuerpos in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

En ciertas formas de realización, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo conjugado a una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, ver WO 81/01145) en un fármaco activo, tales como un fármaco anti–cáncer. Dichos inmunoconjugados son útiles para una terapia de profármaco mediada por enzima dependiente del anticuerpo ("ADEPT"). Las enzimas que se puede conjugar a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalinas, que son útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatases, que son útiles para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, que es útil para convertir 5–fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti–cáncer, 5–fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D–alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D–aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos tales como β–galactosidasa y neuraminidasa, que son útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β–lactamasa, que es útil para convertir fármacos derivados con β–lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa y penicilina G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de aminas con grupos fenoxicetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas se pueden unir en forma covalente a los anticuerpos por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature* 312:604–608 (1984).

d. Carga del fármaco

La carga del fármaco está representada por p, el número promedio de residuos de fármaco por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 residuos de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con una variedad de residuos de fármaco, de 1 a 20. El número promedio de residuos de fármaco por anticuerpo en las preparaciones del ADC a partir de las reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopia de masa, ensayo de ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización del ADC homogéneo donde p es un valor determinado de ADC con otras cargas del fármaco se puede obtener por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Las formulaciones farmacéuticas de los conjugados de anticuerpo y fármaco de Fórmula I en consecuencia pueden ser una mezcla heterogénea de dichos conjugados con anticuerpos unidos a 1, 2, 3, 4, o más residuos de fármaco.

En algunos conjugados de anticuerpo y fármaco, p puede estar limitada por la cantidad de sitios de unión del anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, como en los ejemplos de las formas de realización anteriores, un anticuerpo puede tener uno o varios grupos tiol de la cisteína, o pueden solo uno varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los que se puede unir un ligador. En ciertas formas de realización, la carga de fármaco superior, por ejemplo p >5, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo y fármaco. En ciertas formas de realización, la carga del fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. En efecto, se ha demostrado que para ciertos ADC, la relación óptima de

residuos de fármaco por anticuerpo puede ser menos de 8, y puede ser aproximadamente 2 a aproximadamente 5. *Ver* US 2005–0238649 A1.

En ciertas formas de realización, menos del máximo teórico de los residuos de fármaco se conjugan a un anticuerpo durante una reacción de conjugación reacción. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador, como se describe a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que se pueden unir a un residuo de fármaco; en efecto la mayor parte del tiol de los residuos de cisteína en los anticuerpos existe como puentes disulfuro. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar los grupos reactivos tiol de la cisteína. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupo nucleofílicos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de diferentes modos, por ejemplo, por: (i) limitación del exceso molar del intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador respecto al anticuerpo, (ii) limitación del tiempo o temperatura de la reacción de la conjugación, y (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de la cisteína.

Se entiende que cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un intermediario fármaco-ligador o reactivo ligador seguido por un reactivo del residuo de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de los compuestos de ADC con una distribución de uno o más residuos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla por un ensayo de ELISA dual, que es específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas individuales de ADC se pueden identificar en la mezcla por espectroscopía de masa y separar por HPLC, por

ejemplo cromatografía de interacción hidrofóbica (ver, *por ejemplo*, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selección 19(7):299–307; Hamblett et al (2004) Clin. Cáncer Res. 10:7063–7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti–CD30 antuibody–drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, Marzo de 2004). En ciertas formas de realización, se puede aislar un ADC homogéneo con un valor de carga único a partir de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

e. Ciertos métodos de preparar inmunoconjugados

Un ADC de Fórmula I se puede preparar por varias vías que emplean reacciones, condiciones, y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un ligando reactivo bivalente para formar un Ab–L Ab-L, por medio de un enlace covalente, seguido por una reacción con un residuo del fármaco D, y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un residuo del fármaco con un reactivo conector bivalente para formar D-L, por medio de un enlace covalente seguido por la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Los ejemplos de métodos adicionales para preparar un ADC de Fórmula I por medio de una última vía se describen en US 2005–0238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente por referencia.

Los grupos nucleofílicos de los anticuerpos incluyen pero sin limitación a: (i) grupos amino N-terminales (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupo tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína y (iv) grupos hidroxilo de azucares o grupos amino cuando el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son

nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de los residuos del conector y reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros ácidos, (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden ser reactivos por conjugación con reactivos ligadores por el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de modo que el anticuerpo sea reducido en forma total o parcial. Cada puente de cisteína de este modo formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano, por ejemplo, por la reacción de los residuos de lisina con 2–iminotiolano (reactivo de Traut) t) que produce la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo por la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo,, preparación de anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativa).

Los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención también se pueden producir por la reacción entre un grupo eletrofílico sobre un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleofílico en un reactivo ligador o fármaco. Los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo ligador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina, y arilhidrazida. En una forma de realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrofílicos que son capaces de reaccionar con los sustituyentes nucleofílicos del reactivo ligador o fármaco. En otra forma de realización, los azúcares de los anticuerpos glicosilados se puede oxidar por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar

con el grupo amina de los reactivos ligadores o residuos del fármaco. Los grupos de la base de Schiff imina pueden formar un base una unión estable o se puede reducir, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede producir los grupos carbonilo (aldehído y cetona) la proteína que puede reaccionar con los grupos apropiados del fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, que origina la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146, US 5.362.852). Tal aldehído se puede hacer reaccionar con un residuo del fármaco o nucleófilo ligador.

Los grupos nucleofílicos de un residuo del fármaco incluyen pero sin limitación a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos, residuos del ligador y reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros ácidos, (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

Los compuestos de la invención contemplados expresamente, pero sin limitación, ADC se preparan con los siguientes reactivos de reactividad cruzada: 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–vinilsulfone)benzoato) que están disponibles en el comercio (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, ILO., U.S.A; ver páginas 467–498, 2003–2004 Applications Handbook y Catalog.

Los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico también se pueden obtener usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N–succinimidil–3–(2–piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil–4–(N–maleimidometil)ciclohexano–1–carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En forma alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico se puede preparar por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud de la molécula de ADN puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y las porciones citotóxicas del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En aún otra forma de realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en un tumor que pre-dirige al conjugado anticuerpo-receptor administrado al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación mediante un agente de depuración y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Ejemplos de inmunoconjugados – Conjugados de tio–anticuerpo y fármaco

a. Preparación de anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína

El ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína y los anticuerpos anti–FcRH5 originales de la invención se preparan por una variedad de métodos que incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales), preparación mutagénesis dirigida a la sitio (o mediada por oligonucleótidos) (Carter (1985) et al Acids nucleic Res. 13:4431–4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51–59; Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252–20260), PCR mutagénesis (Higuchi, (1990) en PCR Protocols, pp,177–183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67–70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126–132; y Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723–733), y mutagénesis por casete (Wells et al (1985) Gene 34:315–323) de un ADN preparado antes que codifica el polipéptido. Los protocolos, kits y reactivos de mutagénesis están disponibles en el comercio, por ejemplo QuikChange® Multi Site–Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones únicas también se generan por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos usando un ADN de plásmido bicatenario como templado por mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edición; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468–500; Zoller, M.J. y Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487–6500). Las variantes de anticuerpos recombinantes también se pueden construir por manipulación de fragmentos por restricción o por PCR de extensión superpuesta con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican los reemplazos codónicos de cisteína. Las técnicas de mutagénesis estándares se pueden emplear para generar ADN que codifica dichos

anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína mutantes (Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biología, Greene Publishing y Wiley–Interscience, New York, N.Y., 1993).

La tecnología de despliegue en fagos (McCafferty et al (1990) Nature 348:552–553) se puede usar para producir anticuerpos anti–FcRH5 y fragmento de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios del gen dominio variable (V) de la inmunoglobulina a partir de dadores no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe estas propiedades. En consecuencia, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. (Johnson et al (1993) Current Opinion in Structural Biología 3:564–571; Clackson et al (1991) Nature, 352:624–628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581–597; Griffith et al (1993) EMBO J. 12:725–734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Los anticuerpos anti–FcRH5 se pueden sintetizar químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. La secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de esta se pueden producir por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (Stewart et al., Solid–Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Libreman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149–2154). La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis en fase sólida automatizada se puede

lograr, por ejemplo, empleando aminoácidos protegido t–BOC o Fmoc y usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Varias porciones del anticuerpo anti–FcRH5 o polipéptido de FcRH5 se pueden sintetizar químicamente en forma separada y se combinan usando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti–FcRH5 o polipéptido de FcRH5 deseados.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de los fragmentos de anticuerpo. En forma tradicional, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biofisical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 o se pueden producir directamente por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar y secretar en *E. coli*, en consecuencia permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpo descriptas en la presente. En forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar los fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)) o se pueden aislar directamente del cultivo de célula huésped recombinante. El anticuerpo anti–FcRH5 puede ser un fragmento de cadena única de Fv (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). El fragmento del anticuerpo anti–FcRH5 también puede ser un "anticuerpo lineal" (US 5641870). Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti–FcRH5 al cultivar células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-FcRH5. El ADN que codifica anticuerpos anti–FcRH5 se puede obtener de una biblioteca de ADNc preparada del tejido que se

considera que posee el ARNm del anticuerpo anti–FcRH5 y lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, un ADN del anticuerpo anti–FcRH5 o polipéptido de FcRH5 humano se puede obtener de modo conveniente a partir de una biblioteca de ADNc preparada de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 también se puede obtener de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácido nucleico automatizada).

El diseño, selección, y preparación de los métodos de la invención permite obtener anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína que son reactivos con grupos funcionales electrofílicos. Estos métodos además permiten obtener compuestos de conjugado de anticuerpo tales como conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), compuestos con moléculas de fármaco en sitios designados, diseñados y selectivos. Los residuos de cisteína reactivos en la superficie del anticuerpo permiten conjugar específicamente un residuo de fármaco a través de un grupo tiol reactivo tales como maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleofílica del grupo funcional tiol de un residuo Cys a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con cualquier otro grupo funcional del aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de los residuos de lisina o el grupo amino N–terminal. La funcionalidad especifica del tiol en los reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con los grupos aminos, pero se requieren mayor pH (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, Non–Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). La cantidad de tiol libre en una proteína se puede estimar por el ensayo de Ellman estándar. La inmunoglobulina M es un ejemplo de pentámero unido por disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplos de proteína con puentes disulfuro internos que unen las subunidades entre sí. En las proteínas tales como esta, se requiere la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditiotreitol (DTT) o selenol (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147–156) para

generar el tiol reactivo libre. Este método puede producir la pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo y la especificidad de unión del antígeno.

El ensayo PHESELECTOR (ELISA de fago para la selección de tioles reactivos) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en los anticuerpos en un formato de fago ELISA de este modo asistir en el diseño de anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41–52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína está recubierto en las superficies del pocillo, seguido por incubación con las partículas del fago, adición de anticuerpo secundario marcado con HRP, y detección de absorbancia. Las proteínas mutantes desplegadas en el fago se analizan de una manera rápida, robusta y de alto rendimiento. Se pueden producir bibliotecas de anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína y se someten a la selección de unión usando el mismo método para identificar sitios reactivos apropiados de incorporación de Cys libre a partir de bibliotecas de fagos de proteína aleatoria de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye la reacción de proteínas mutantes de cisteína desplegadas en fago con un reactivo de afinidad o grupo indicador que es también reactivo al tiol.

El ensayo PHESELECTOR permite la detección de grupos tiol reactivos en los anticuerpos. La identificación de la variante A121C por este método es ejemplificativa. La molécula de Fab entera se puede buscar efectivamente para identificar más variantes de TioFab con grupos tiol reactivos. Se empleó un parámetro, accesibilidad de superficie fraccional, para identificar y cuantificar la accesibilidad del solvente a los residuos de aminoácidos en un polipéptido. La accesibilidad de superficie se puede expresar como el área de superficie ($Å^2$) que se puede poner en contacto con una molécula del solvente, por ejemplo agua. El espacio ocupado del agua se aproxima a una esfera de radio 1,4 Å. El programa de computación está disponible libremente o bajo licencia (Secretary to CCP4, Daresbury laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax:

(+44) 1925 603825, o por internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/ÍNDICE.html) como conjunto CCP4 de programas de cristalografía que emplean algoritmos para calcular la accesibilidad de superficie de cada aminoácido de una proteína con coordenadas derivadas de cristalografía de rayos X ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760–763). Dos ejemplos de módulos de software que realizan los cálculos de accesibilidad de superficie son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B.Lee y F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379–400. AREAIMOL define la superficie accesible al solvente de una proteína como el locus del centro de una esfera de prueba (que representa una molécula de solvente) a medida que gira sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula el área de superficie accesible al solvente por la generación de puntos de superficie en una esfera extendida alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma del átomo y el radio de prueba), y que elimina los que residen dentro de esferas equivalentes asociados con átomos vecinos. AREAIMOL halla el área accesible al solvente de los átomos en un archivo coordenada de PDB y sintetiza el área accesible por residuo, por cadena y por una molécula completa. Las áreas accesibles (o diferencias de área) para los átomos individuales se pueden escribir en un archivo de salida pseudo–PDB. AREAIMOL asume un radio único para cada elemento y solo reconoce una cantidad limitada de elementos diferentes.

AREAIMOL y SURFACE informan accesibilidades absolutas, es decir, el número de Angstrom al cuadrado (Å). La accesibilidad de superficie fraccional se calcula con referencia a un estado estándar relevante para un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es el tripéptido Gly–X–Gly, donde X es el aminoácido de interés, y el estado de referencia debería ser una conformación 'extendida', es decir, como las de las cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área accesible calculada se divide por el área

accesible de un estado de referencia del tripéptido Gly–X–Gly y se informa el cociente, que es la accesibilidad fraccional. El por ciento de accesibilidad es la accesibilidad fraccional multiplicada por 100. Otro ejemplo de algoritmo para calcular la accesibilidad de superficie se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broger, C., F. Hoffman–LaRoche, Basel) que calcula la accesibilidad fraccional de un residuo de aminoácido a una esfera de agua basada en las coordenadas de rayos X del polipéptido. La accesibilidad fraccional de superficie para cada aminoácido en un anticuerpo se puede calcular usando la información de estructura cristalina disponible (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969–995).

El ADN que codifica los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos murinos). Las células del hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en las células huésped tales como células de E. coli, células de simio COS, células de ovario de hámster chino (CHO) u otras células huésped de mamífero, tales como células de mieloma (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) que no producen de otro modo la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

Después del diseño y selección, los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína, por ejemplo TioFab, con el residuo de Cys no apareado altamente reactivo, manipulado genéticamente, "aminoácidos de cisteína libre", se puede producir por: (i) expresión en una sistema bacteriano, por ejemplo E. coli, (Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256–262; Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130:151–188) o un sistema de cultivo de célula de mamífero (WO 01/00245), por ejemplo

células de ovario de hámster chino (CHO); y (ii) purificación usando técnicas de purificación de proteínas comunes (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982–10988).

Los grupos tiol con Cys manipulada genéticamente reaccionan con los reactivos ligadores electrofílicos y los intermediarios fármaco-ligador para formar los conjugados de anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína y fármaco y otros anticuerpos marcados manipulados genéticamente en cisteína. El residuo Cys de los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína, y presente en los anticuerpos originales, que son apareados y formar enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios no tienen grupos tiol reactivos (a menos que se traten con un agente reductor) y no reaccionar con los reactivos ligadores electrofílicos o intermediarios fármaco-ligador. El residuo de Cys recién manipulado genéticamente, puede permanecer sin aparear y puede reaccionar, es decir, conjugarse con un reactivo ligador electrofílico o intermediario fármaco-ligador, tales como un fármaco–maleimida. Los ejemplos de intermediarios fármaco-ligador incluyen: MC–MMAE, MC–MMAF, MC–vc–PAB–MMAE, y MC–vc–PAB–MMAF. Las posiciones estructurales de los residuos de Cys manipulados genéticamente de las cadenas pesada y liviana se numeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se correlaciona con el Sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que comienza en el extremo N–terminal, difiere del esquema de numeración de Kabat (hilera inferior) por las inserciones indicadas por a,b,c. Mediante el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener pocos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción, de una FR o CDR del dominio variable. Lo sitios de la variante de la cadena pesada con cisteína manipulada genéticamente se identifican por los esquemas de numeración secuencia y numeración de Kabat.

En una forma de realización, el anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína se prepara por un proceso que comprende:

(a) reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 original por cisteína; y

(b) determinar la reactividad tiol del anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína por la reacción del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un agente reactivo con tiol.

El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo original con el agente reactivo con tiol.

Los residuos de aminoácidos de cisteína libre se pueden ubicar en las cadenas pesada o liviana, o en los dominios constante o variable. Los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo Fab, también se puede manipular genéticamente con uno o más aminoácidos de cisteína que reemplazan los aminoácidos del fragmento de anticuerpo, para formar los fragmentos del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína.

Otra forma de realización de la invención proporciona un método de preparar (fabricar) un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína, que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo anti–FcRH5 original para generar el anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína; y

(b) determinar la reactividad tiol del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un agente reactivo con tiol;

en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína es más reactivo que el anticuerpo original con el agente reactivo con tiol.

La etapa (a) del método de preparar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína puede comprender:

(i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína;

(ii) expresar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína; y

(iii) aislar y purificar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína.

La etapa (b) del método de preparar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína puede comprender expresar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína en una partícula viral seleccionada de una partícula de fago o fagémido.

La etapa (b) del método de preparar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína también puede comprender:

(i) reacción del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad y

(ii) medir la unión del el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad en un medio de captura.

Otra forma de realización de la invención es un método de analizar anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína con aminoácidos de cisteína no apareados, altamente reactivos para determinar reactividad tiol que comprende:

(a) introducir uno o más aminoácidos de cisteína en un anticuerpo original para generar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína;

(b) hacer reaccionar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad; y

(c) medir la unión del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad en un medio de captura; y

(d) determinar la reactividad tiol del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con el agente reactivo con tiol.

La etapa (a) del método de detección de anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína pueden comprender:

(i) mutagenizar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína;

(ii) expresar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína; y

(iii) aislar y purificar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína.

La etapa (b) del método de identificar anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína puede comprender expresar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína en una partícula viral seleccionada de una partícula de fago o fagémido.

La etapa (b) del método de identificar anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína también puede comprender:

(i) hacer reaccionar el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un reactivo de afinidad reactivo con tiol para generar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad; y

(ii) medir la unión del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con marcación de afinidad en un medio de captura.

b. Manipulación genética de cisteína de variantes de IgG de anti–FcRH5

La cisteína fue introducida en el sitio 118 de la cadena pesada 118 (numeración de EU) (equivalente a la posición de la cadena pesada 118, numeración secuencial) en los anticuerpos monoclonales anti–FcRH5 originales quiméricos de longitud completa o en el sitio 205 de la cadena liviana (numeración de Kabat) (equivalente a la posición de la cadena liviana 209, numeración secuencial) en los anticuerpos monoclonales anti–FcRH5 originales quiméricos de longitud completa por los métodos de manipulación genética de cisteína descriptos en la presente.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína con cisteína en la cadena pesada 118 (numeración de EU) generados fueron: (a) tio–hu10A8 v1–HC(A118C) con la secuencia de la cadena pesada

(SEQ ID NO: 42) y secuencia de la cadena liviana (SEQ ID NO: 41), Figura 12.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína con cisteína en la cadena liviana 205 (numeración de Kabat) generados fueron: (a) tio–hu10A8 v1–LC9(V205C) con la secuencia de la cadena pesada (SEQ ID NO: 44) y secuencia de la cadena liviana (SEQ ID NO: 43), La Figura 13.

Estos anticuerpos monoclonales manipulados genéticamente en cisteína se expresaron en células CHO (ovario de hámster chino) por fermentación transitoria en un medio que contiene 1 mM de cisteína.

c. Anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína marcados

Los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína se pueden acoplar en forma específica de sitio y eficiente con un agente reactivo con tiol. El agente reactivo con tiol puede ser un reactivo ligador multifuncional, de captura de marca, es decir, afinidad (por ejemplo un reactivo biotina–ligador), una marca de detección (por ejemplo un reactivo fluoróforo), un reactivo de inmovilización de fase sólida (por ejemplo SEPHAROSE™, poliestireno o vidrio), o un intermediario fármaco-ligador. Un ejemplo de un agente reactivo con tiol es N–etil maleimida (NEM). En un ejemplo de forma de realización, la reacción de un TioFab con un reactivo biotina-ligador proporciona un TioFab biotinilado por medio del cual se puede detectar y medir la presencia y reactividad del residuo de cisteína manipulado genéticamente. La reacción de un TioFab con un reactivo ligador multifuncional proporciona un TioFab con un ligador funcionalizado que puede reaccionar adicionalmente con un reactivo del residuo de fármaco u otra marca. La reacción de un TioFab con un intermediario fármaco-ligador proporciona un conjugado de TioFab y fármaco.

Los ejemplos de métodos aquí descriptos se pueden aplicar generalmente a la identificación y producción de anticuerpos, y más

generalmente, a otras proteínas mediante la aplicación de las etapas de diseño y selección descriptas en la presente.

Dicho método se puede aplicar a la conjugación de otros agentes reactivos con tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otros compañeros de conjugación reactivos con tiol (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non–Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40–55, 643–671). El agente reactivo con tiol puede ser un residuo de fármaco, un fluoróforo tal como un colorante fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante de metal para imágenes o radioterapia, una marca peptidilo o no peptidilo o rótulo de detección, o un agente modificador de la depuración tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico.

d. Usos de anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína

Los anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína, y sus conjugados se pueden utilizar como agentes terapéuticos y/o diagnóstico. La presente invención además proporciona métodos de prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un Trastorno relacionado con las células B. En particular, la presente invención proporciona métodos de prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno proliferativo celular, tales como cáncer, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL),

leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto. La presente invención además proporciona métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con FcRH5 o predisposición para desarrollar dicho trastorno, así como métodos para identificar anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, que unen con preferencia célula polipéptidos de FcRH5 asociados con las células B.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad que responde a un trastorno relacionado con las células B.

e. Conjugados de anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína y fármaco (conjugados de tio-anticuerpo y fármaco (TDC))

Otro aspecto de la invención es un el compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína (Ab), y un residuo de fármaco auristatina (D) en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libres con un residuo ligador (L) a D; the compuesto que tiene Fórmula I:

$Ab–(L–D)_p$ I

donde p es 1, 2, 3, o 4; y en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína se prepara por un proceso que comprende reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 original con uno o más aminoácidos de cisteína libre.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una mezcla de compuestos de anticuerpo–fármaco de Fórmula I donde la carga de fármaco promedio por anticuerpo es aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

Las ventajas potenciales de los conjugados anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína y fármaco incluyen mejor seguridad (índices terapéuticos más grandes), mejores parámetros PK, los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo retenidos pueden

estabilizar el conjugado y retiñe su conformación de unión activa, los sitios conjugación al fármaco están definidos y la preparación de los conjugados de anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína y fármaco a partir de la conjugación de los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína a los reactivos ligadores del fármaco generan un producto más homogéneo.

Ligadores

"Ligador", "unidad ligadora", o "unión" significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une de modo covalente un anticuerpo a un residuo de fármaco. En varias formas de realización, un ligador se especifica comos L. Un "ligador" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que se puede usar para ligar uno o más residuos de fármaco (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de Fórmula I. Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) se pueden preparar de modo conveniente usando un ligador que tiene grupos funcionales reactivos para unir al Fármaco y al anticuerpo. Un tiol de la cisteína de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional electrofílico de un reactivo ligador, un residuo de fármaco o intermediario fármaco-ligador.

En un aspecto, un ligador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrofílico que es reactivo con una cisteína nucleofílica presente en un anticuerpo. El tiol de la cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrofílico en un ligador y forma un enlace covalente con un ligador. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

Los ligadores incluyen un radical divalente tal como un alquildiílo, un arileno, un heteroarileno, restos tales como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetidas de alquiloxi (por ejemplo polietilenoxi, PEG, polimetilenoxi) y alquilamino (por ejemplo polietilenamino, Jeffamine™); y

éster diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato, y caproamida.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína reaccionan con los reactivos ligadores o intermediarios fármaco-ligador, con los grupos funcionales electrofílicos tales como maleimida o α–halo carbonilo, de acuerdo con un método de conjugación de la página 766 de Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765–773.

El ligador puede estar compuesto de uno o más componentes ligadores. Los ejemplos de componentes ligadores incluyen 6–maleimidocaproílo ("MC"), maleimidopropanoílo ("MP"), valina–citrulina ("val–cit" o "vc"), alanina–fenilalanina ("ala–phe" o "af"), p–aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N–succinimidil 4–(2–piridiltio)pentanoato ("SPP"), 4–(N–maleimidometil)ciclohexano–1 carboxilato de N–succinimidilo ("SMCC'), (4–yodo–acetil) aminobenzoato de N–succinimidilo ("SIAB"), etilenoxi–CH_2CH_2O– como una o más unidades repetidas ("EO" o "PEO"). Los componentes ligadores adicionales son conocidos en la técnica y algunos se describen en la presente.

En una forma de realización, el ligador L de un ADC tiene la fórmula:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

en donde:

–A– es una unidad de extensión unido covalentemente a un tiol de la cisteína del anticuerpo (Ab);

a es 0 o 1;

cada –W– es de modo independiente una unidad de aminoácido;

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

–Y– es una unidad espaciadora unida covalentemente al residuo de fármaco; y

y es 0, 1 o 2.

Unidad de extensión

La unidad de extensión (–A–), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpo a una unidad de aminoácido (–W–). En este aspecto un anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de un extensor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, sea en forma natural o por medio de manipulación química incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo (–SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales del anticuerpo son sulfhidrilo o amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar por la reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos se pueden generar por la reacción de un grupo amino de un residuo de lisina de un anticuerpo usando 2–iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilo. En una forma de realización, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo tiol de la cisteína libre que puede formar un enlace con un grupo funcional electrofílico de una unidad de extensión. Los ejemplos de conjugados de las unidades de extensión de la Fórmula I están representados por las Fórmulas II y III, en donde Ab–, –W–, –Y–, –D, w e y son las que se definieron antes y R^{17} es un radical divalente seleccionado de $(CH_2)_r$, carbociclilo C_3–C_8, O–$(CH_2)_r$, arileno, $(CH_2)_r$–arileno, –arilene–$(CH_2)_r$–, $(CH_2)_r$–(carbociclilo C_3–C_8), (carbociclilo C_3–C_8)–$(CH_2)_r$, heterociclilo C_3–C_8, $(CH_2)_r$–(heterociclilo C_3–C_8, –(heterociclilo C_3–C_8–$(CH_2)_r$–, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, y $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$; donde R^b es H, alquilo C_1–C6, fenilo, o bencilo; y r es de modo independiente un número entero que varía de 1–10.

Arileno incluye radicales hidrocarbonados aromáticos divalentes de 6–20 átomos de carbono derivados de la eliminación de dos átomos de

hidrogeno del sistema de anillo aromático. Los grupos amileno típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

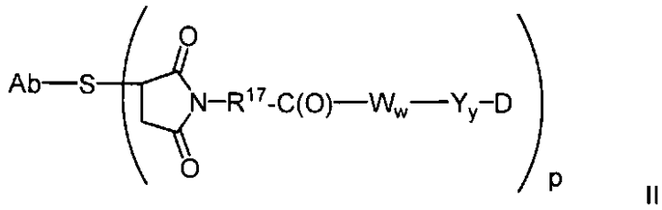
Los grupos heterociclilo incluyen un sistema anular en que uno o más átomos anulares es un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno, y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta el presente), en particular Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Los ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo(piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzimidazolilo, piperidinilo, 4–piperidonilo, pirrolidinilo, 2–pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis–tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis–tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triacinilo, 6H–1,2,5–tiadiacinilo, 2H,6H–1,5,2–ditiacinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, phenoxathinilo, 2H–pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, piracinilo, piridacinilo, indolicinilo, isoindolilo, 3H–indolilo, 1H–indazolilo, purinilo, 4H–quinolicinilo, ftalacinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4Ah–carbazolilo,

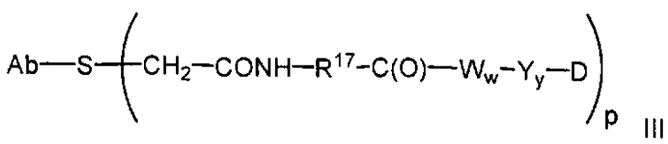
carbazolilo, β–carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenacinilo, fenotiacinilo, furazanilo, fenoxacinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperacinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, y isatinoilo.

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

Se comprende a partir de todos los ejemplos de formas de realización del ADC de Fórmula I tal como II–VI, que aun cuando no se indique expresamente, de 1 a 4 residuos de fármaco se unen a un anticuerpo (p = 1–4), según el número de residuos de cisteína manipulados genéticamente .

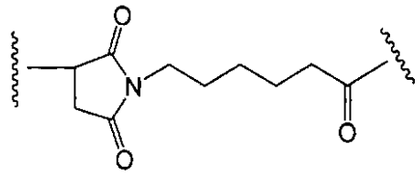


II



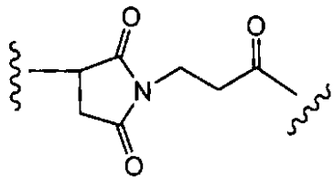
III

Una unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa deriva de maleimido–caproílo (MC) en donde R^{17} es $-(CH_2)_5-$:



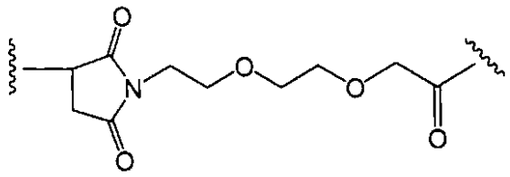
MC

Una unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa deriva de maleimido–propanoílo (MP) en donde R^{17} es $-(CH_2)_2-$:

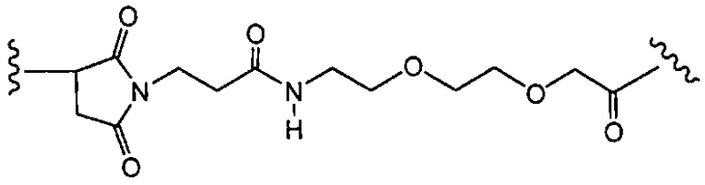


MP

Otra unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa en donde R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y r es 2:

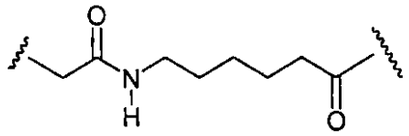


Otra unidad de extensión de Fórmula II ilustrativa en donde R^{17} es $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ donde R^b es H y cada r es 2:

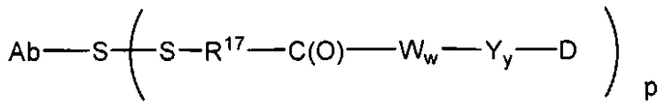


MPEG

Una unidad de extensión de Fórmula III ilustrativa en donde R^{17} es $-(CH_2)_5-$:

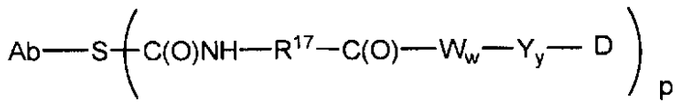


En otra forma de realización, la unidad de extensión se une al anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína por medio de un enlace disulfuro entre átomo de azufre de la cisteína manipulada genéticamente del anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta forma de realización se representa con la Fórmula IV, en donde R^{17}, Ab–, –W–, –Y–, –D, w e y son como se definieron anteriormente.

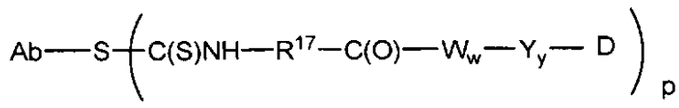


IV

En aún otra forma de realización, el grupo reactivo del extensor contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de la cisteína libre de un anticuerpo. Los ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero sin limitación, maleimida, α–haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4–nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, ésteres de anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades de extensión representativas de esta forma de realización están representadas por las Fórmulas Va y Vb, en donde $–R^{17}–$, Ab–, –W–, –Y–, –D, w e y son como se definieron anteriormente;



Va



Vb

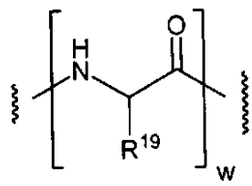
En otra forma de realización, el ligador puede ser un ligador tipo dendrítico para la unión covalente de más de un residuo de fármaco a través de un residuo ligador multifuncional de ramificación a un anticuerpo

(Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213–2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761–1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987–1990). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar del fármaco al anticuerpo, es decir, la carga, que se relaciona con la potencia del ADC. En consecuencia, cuando un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína porta solo un grupo reactivo de tiol de la cisteína, una multitud de residuos de fármaco se pueden unir a través de un ligador dendrítico.

Unidad de aminoácido

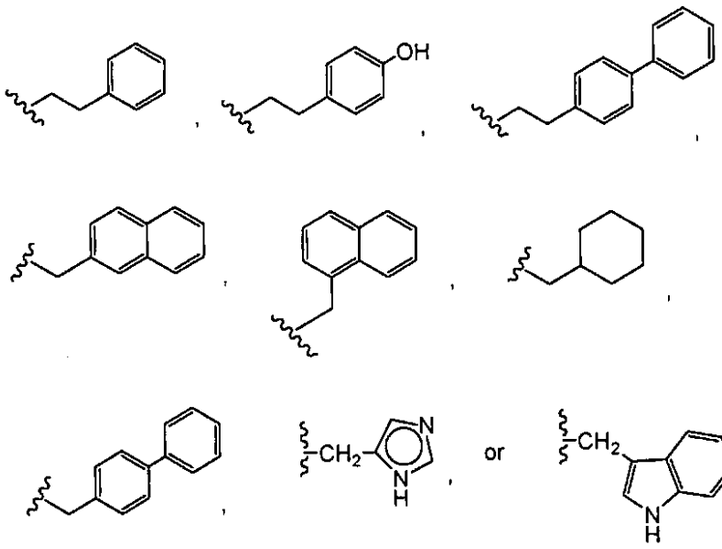
El ligador puede comprender residuos de aminoácidos. La unidad de aminoácido (–W_w–), cuando está presente, se liga el anticuerpo (Ab) al residuo de fármaco (D) del conjugado del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína y fármaco (ADC) de la invención.

–W_w– es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácido incluyen los naturales, así como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos naturales, tales como citrulina. Cada unidad –W– de modo independiente tiene la fórmula que se indica a continuación en los corchetes, y w es un número entero que varía de 0 a 12:



en donde R^{19} es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec–butilo, bencilo, p–hidroxibencilo, $–CH_2OH$, $–CH(OH)CH_3$, $–CH_2CH_2SCH_3$, $–CH_2CONH_2$, $–CH_2COOH$, $–CH_2CH_2CONH_2$, $–CH_2CH_2COOH$, $–(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $–(CH_2)_3NH_2$, $–(CH_2)_3NHCOCH_3$, $–(CH_2)_3NHCHO$, $–(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $–(CH_2)_4NH_2$, $–(CH_2)_4NHCOCH_3$, $–(CH_2)_4NHCHO$, –

$(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2–piridilmetil–, 3–piridilmetil–, 4–piridilmetil–, fenilo, ciclohexilo,



Cuando R^{19} es diferente de hidrógeno, el átomo de carbono al que se une R^{19} es quiral. Cada átomo de carbono al que se une R^{19} está de modo independiente en la configuración (S) o (R) o una mezcla racémica. Las unidades de aminoácidos en consecuencia pueden ser enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

Los ejemplos de unidades de aminoácidos $-W_w-$ incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina–citrulina (vc o val–cit), alanina–fenilalanina (af o ala–phe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina–valina–citrulina (gly–val–cit) y glicina–glicina–glicina (gly–gly–gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente ligador de aminoácido incluyen los naturales, así como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos naturales, tales como citrulina.

La unidad de aminoácido se puede escindir enzimáticamente con una o más enzimas, que incluye una proteasa asociada a tumor, para el residuo de fármaco (–D), que en una forma de realización se protona in vivo después de la liberación para proporcionar un Fármaco (D). Los

componentes ligadores de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para escisión enzimática enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada al tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Unidad espaciadora

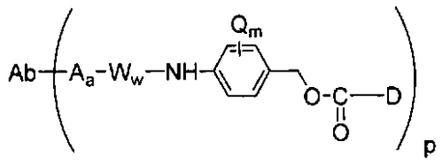
La unidad espaciadora ($-Y_y-$), cuando está presente (y = 1 o 2), liga una unidad de aminoácido ($-W_w-$) al residuo de fármaco (D) cuando está presente una unidad de aminoácido (w = 1–12). En forma alternativa, la unidad espaciadora liga la unidad de extensión al residuo de fármaco cuando está ausente la unidad de aminoácido. La unidad espaciadora también liga el residuo de fármaco a la unidad del anticuerpo cuando están ausentes la unidad de aminoácido y la unidad de extensión (w, y = 0). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autodestructivo y no autodestructivo. Una unidad espaciadora de no autodestructivo es una en que parte o el total de la unidad espaciadora permanece unida al residuo del fármaco después de la escisión, en particular enzimática, de una unidad de aminoácido a partir del conjugado de anticuerpo y fármaco o el ligador del residuo de fármaco. Cuando un ADC que contiene una unidad espaciadora de glicina–glicina o una unidad espaciadora de glicina experimenta la escisión enzimática por medio de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a las células cancerosas o proteasa asociada linfocitos, un residuo glicina–glicina–fármaco o un residuo glicina–fármaco se escinde del $Ab–A_a–Ww–$. En una forma de realización, una reacción de hidrólisis independiente tiene lugar en la célula blanco, escinde el enlace del residuo glicina–fármaco y libera el fármaco.

En otra forma de realización, $–Y_y–$ es una unidad p–aminobencilcarbamoilo (PAB) cuya porción fenileno está sustituida con Q_m en donde Q es –alquilo $C_1–C_8$, –O–(alquilo $C_1–C_8$), –halógeno,– nitro o –ciano; y m es un número entero que varía de 0–4.

Los ejemplos de formas de realización de una unidad espaciadora de no autodestructivo (–Y–) son: –Gly–Gly– ; –Gly– ; –Ala–Phe– ; –Val–Cit– .

En una forma de realización, un residuo ligador de fármaco o se proporciona un ADC en que la unidad espaciadora está ausente (y=0), o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

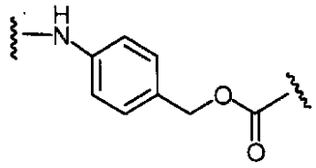
Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora autodestructivo puede liberar –D. En una forma de realización, –Y– es un grupo PAB que se liga a $-W_w-$ por medio del átomo de nitrógeno amino del grupo PAB y se conecta directamente a –D por medio de un grupo carbonato, carbamato o éter, donde el ADC tiene el ejemplo de estructura:



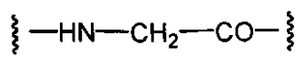
en donde Q es –alquilo C_1–C_8, –O–(alquilo C_1–C_8), –halógeno, –nitro o –ciano; m es un número entero que varía de 0–4; y p varía de 1 a 4.

Otros ejemplos de espaciadores autodestructivo incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2–aminoimidazol–5–metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), análogos heterocíclicos de PAB (US 2005/0256030), beta–glucurónido (WO 2007/011968), y orto o para–aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que experimentan la ciclación después de la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácidos 4–aminobutírico sustituidos o no sustituidos (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biología 2:223), sistemas anulares biciclo[2,2,1] y biciclo[2,2,2] apropiadamente sustituidos (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); y amidas del ácido 2–aminofenilpropiónico(Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). La eliminación de los fármacos que contienen amina que están sustituidas en la glicina (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447) también son ejemplos de espaciadores autodestructivo útiles en los ADC

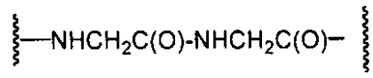
Los ejemplos de unidades espaciadoras ($-Y_y-$) está representados por las Fórmulas X–XII:



X



XI

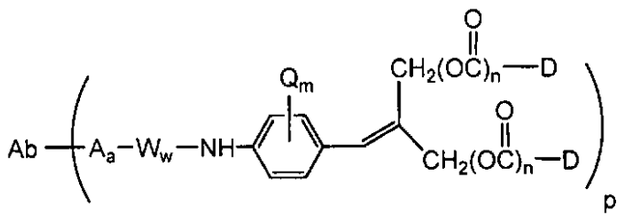


XII

Ligadores dendríticos

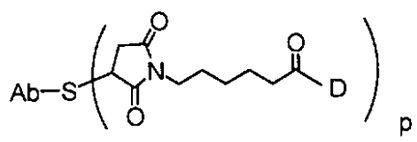
En otra forma de realización, el ligador L puede ser un ligadro tipo dendrítico para la unión covalente de más de un residuo de fármaco a través de un residuo ligador de ramificación, multifuncional a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213–2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761–1768). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar del fármaco al anticuerpo, es decir, la carga, que se relaciona con la potencia del ADC. En consecuencia, cuando un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína porta solo un grupo reactivo de tiol de la cisteína, una multitud de residuos de fármaco se pueden unir a través de un ligador dendrítico. Los ejemplos de formas de realización de ligadores dendríticos ramificados incluyen unidades de dendrímeros de 2,6–bis(hidroximetil)–p–cresol y 2,4,6–tris(hidroximetil)–fenol (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688–15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726–1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494–4499).

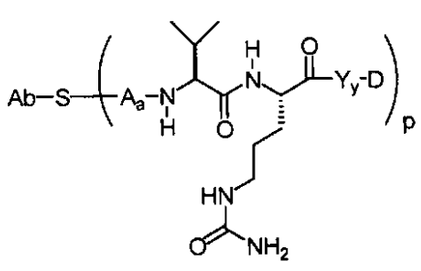
En una forma de realización, la unidad espaciadora es un bis(hidroximetil)estireno ramificado (BHMS), que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que tienen la estructura:



que comprende una unidad de dendrímero de 2–(4–aminobenciliden)propano–1,3–diol (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490–4494), en donde Q es –alquilo C_1–C_8, –O–(alquilo C_1–C_8), –halógeno, –nitro o –ciano; m es un número entero que varía de 0–4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a 4.

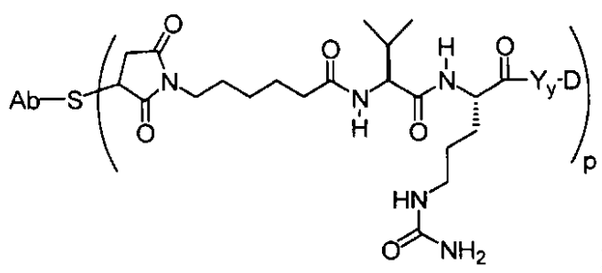
Los ejemplos de formas de realización de la Fórmula I de compuestos de conjugado de anticuerpo y fármaco incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val–cit), XIIIc (MC–val–cit), y XIIId (MC–val–cit–PAB):



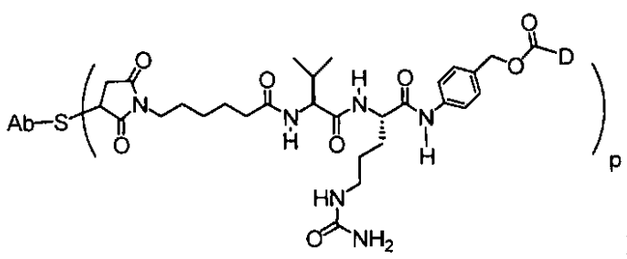


XIIIa

XIIIb

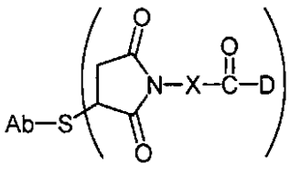


XIIIc

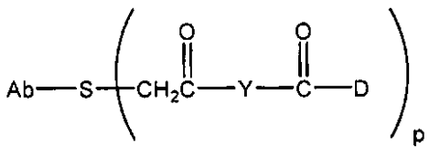


XIIId

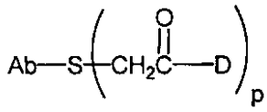
Otros ejemplos de formas de realización de la Fórmula Ia compuestos de conjugado de anticuerpo y fármaco incluyen XIVa–e:



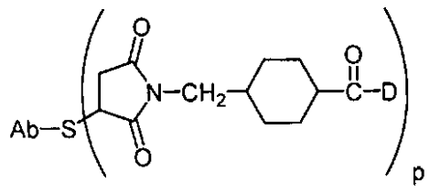
XIVa



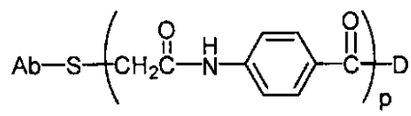
XIVb



XIVc

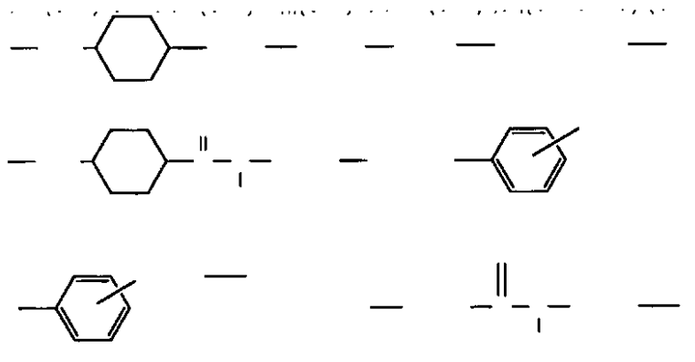


XIVd

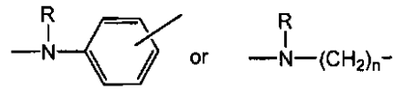


XIVe

donde X es:



Y es:



y R es de modo independiente H o C_1–C_6 alquilo; y n es 1 a 12.

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

Normalmente, los ligadores tipo péptidos se pueden preparar por la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos del péptido. Tales enlaces de péptidos se pueden preparar, por ejemplo de acuerdo con el métodos de síntesis en fase líquida (ver E. Schröder y K. Lübke, "The Peptide", volumen 1, paginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los intermediarios del ligador se pueden ensamblar con

cualquier combinación o secuencia de reacciones que incluyes unidad espaciadora, de extensión y de aminoácidos. La unidad espaciadora, de extensión y de aminoácidos pueden emplear grupos funcionales reactivos que son de naturaleza electrofílica, nucleofílica, o radicales libres. Los Reactive grupos funcionales reactivos incluyen, pero sin limitación carboxilos, hidroxilos, para–nitrofenilcarbonato, isotiocianato, y grupos salientes, tales como O–mesilo, O–tosilo, –Cl, –Br, –I; o maleimida.

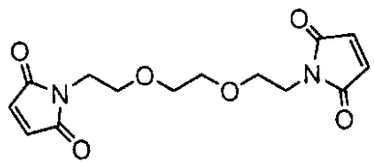
Por ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato ($–SO_3^-$) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo ligador con el anticuerpo o el residuo de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento del Ab–L (intermediario anticuerpo-ligador) con D, o D–L (intermediario fármaco-ligador) con Ab, según la vía de síntesis empelada para preparar la ADC.

Reactivos ligadores

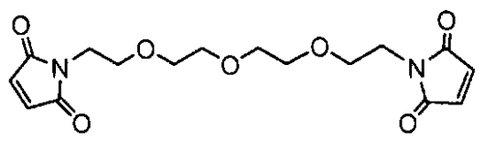
Los conjugados de anticuerpo y auristatina se pueden preparar usando una variedad de reactivos ligadores bifuncionales tales como N–succinimidil–3–(2–piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil–4–(N–maleimidometil)ciclohexano–1–carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

Los conjugados de anticuerpo y fármaco también se pueden preparar con reactivos ligadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC–SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo–EMCS, sulfo–GMBS, sulfo–KMUS, sulfo–MBS, sulfo–SIAB, sulfo–SMCC, y sulfo–SMPB, y SVSB (succinimidil–(4–vinilsulfone)benzoato), y que incluyen reactivos de bis–maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8–bis–

maleimidodietilenglicol ($BM(PEO)_2$), y 1,11–bis–maleimidotrietilenglicol ($BM(PEO)_3$), que están disponible en el comercio en Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, ILO, y otros proveedores de reactivos. Los reactivos de bis–maleimida permiten la unión del grupo tiol de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína, residuo de fármaco que contiene tiol, marca o intermediario ligador, de modo secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína, residuo de fármaco, marca o intermediario ligador incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, disulfuro, disulfuro de piridilo isocianato, e isotiocianato.



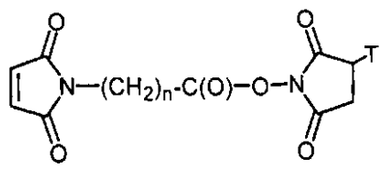
$BM(PEO)_2$



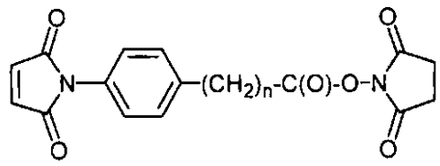
$BM(PEO)_3$

Los reactivos ligadores también se pueden obtener por otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), o sintetizar de acuerdo con los procedimientos descriptos en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866–1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352–5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180–186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

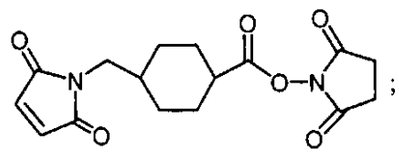
Los extensores de fórmula (IIIa) se pueden introducir en un ligador por la reacción de los siguientes reactivos ligadores con el extremo N–terminal de una unidad de aminoácido:



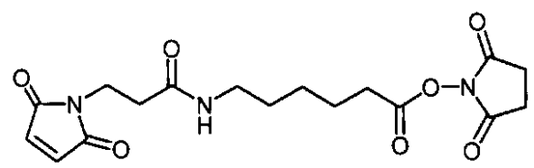
donde n es un número entero que varía de 1–10 y T es –H o –SO_3Na;



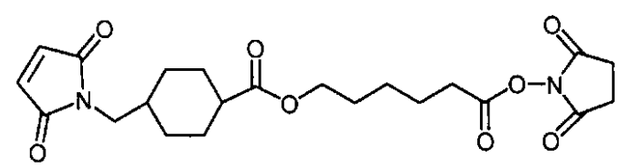
donde n es un número entero que varía de 0–3;



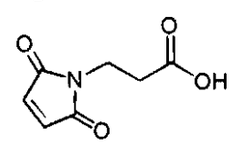
;



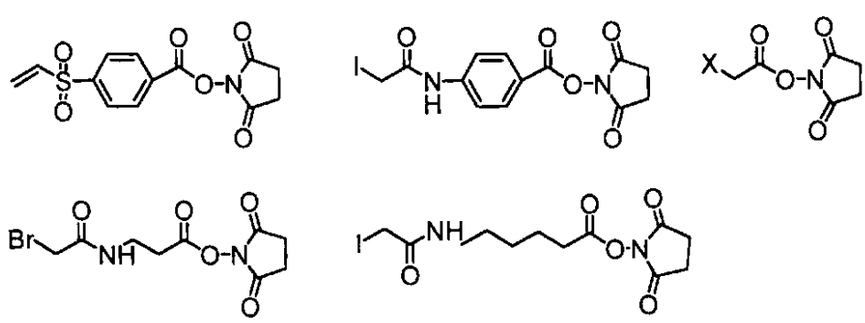
;



; and

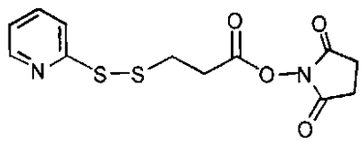


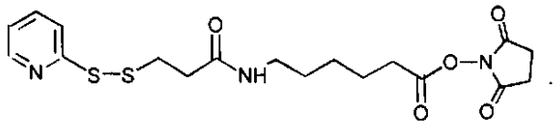
Las unidades de extensión se pueden introducir en un ligador por la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N–terminal de una unidad de aminoácido:

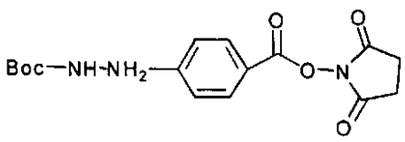


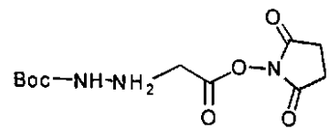
donde X es Br o I.

Las unidades de extensión también se pueden introducir en un ligador por la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N–terminal de una unidad de aminoácido:

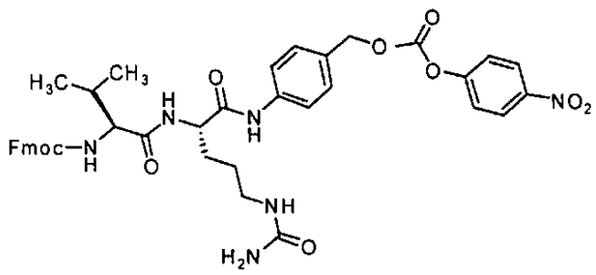




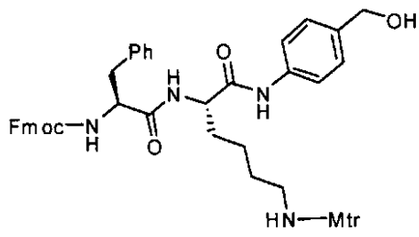




Un ejemplo de reactivo ligador dipeptídico de valina–citrulina (val–cit o vc) que tiene un extensor de maleimida y un espaciador autodestructivo de para–aminobencilcarbamoílo (PAB) tiene la estructura:



Un ejemplo de reactivo ligador dipeptídico de phe–lys(Mtr, mono–4–metoxitritilo) que tiene una unidad de extensión de maleimiaday una unidad espaciadora autodestructivo de PAB se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257–60, y tiene la estructura:



Preparación de conjugados de anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína y fármaco

El ADC de Fórmula I se puede preparar por varias vías, que emplean reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen: (1) reacción de un grupo de cisteína de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un reactivo ligador, para formar el intermediario anticuerpo-ligador Ab–L, por medio de un enlace covalente, seguido por la reacción con un residuo de fármaco activado D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un residuo de fármaco con un reactivo ligador, para formar el intermediario fármaco-ligador D–L, por medio de un enlace covalente, seguido por la reacción con un grupo de cisteína de un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína. Los métodos de conjugación (1) y (2) se pueden emplear con una variedad de anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína, residuos de fármaco, y ligadores para preparar el conjugado de anticuerpo y fármacos de Fórmula I.

Los grupos tiol de la cisteína del anticuerpo son nucleofílico y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en reactivos ligadores e intermediarios de fármaco-ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros ácidos, (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida, (iv) disulfuros, que incluye disulfuro de piridilo, por medio de intercambio de sulfuro. Los grupos nucleofílicos de un residuo de fármaco incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima,

amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con los grupos electrofílicos en los residuos del ligador y los reactivos ligadores.

Los anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos ligadores por el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitol) o TCEP (clorhidrato de tris(2–carboxietil)fosfina; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido por la reoxidación para reformar los enlaces disulfuro inter e intracatenarios (Ejemplo 5). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales manipulados genéticamente en cisteína de longitud completa (TioMabs) expresados en las células CHO se reducen con aproximadamente un exceso molar de 50 veces de TCEP durante 3 horas a 37 °C para reducir los enlaces disulfuro en los aductos de cisteína que se pueden formar entre los residuos de cisteína recién introducidos y la cisteína presente en el medio de cultivo. El TioMab reducido se diluye y carga en una columna HiTrap S de 10 mM de acetato de sodio, pH 5, y se eluye con PBS que contiene 0,3 M de cloruro de sodio. Los enlaces disulfuro se reestablecieron entre los residuos de cisteína presentes en el Mab original con sulfato de cobre acuoso ($CuSO_4$) diluido (200 nM) a temperatura ambiente, toda la noche. Alternativamente, el ácido dehidroascórbico (DHAA) es un oxidante efectivo para restablecer los grupos disulfuro intracatenarios del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína después de la escisión reductora de los aductos de cisteína. Se pueden usar otros oxidantes, es decir, agentes oxidantes y condiciones de oxidación que son conocidas en la técnica. La oxidación al aire del ambiente también es efectiva. Esta etapa de reoxidación parcial, leve forma disulfuros intracatenarios en forma eficiente con alta fidelidad y conserva los grupos tiol de los residuos de cisteína recién introducidos. Se añadió un exceso de aproximadamente 10 veces del intermediario

fármaco-ligador, por ejemplo MC–vc–PAB–MMAE, se mezcló y se dejó decantar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar el conjugado de anticuerpo anti–FcRH5–fármaco. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y se eluyó mediante una columna HiTrap S para eliminar el exceso de intermediario fármaco-ligador y otras impurezas.

Un proceso general para preparar un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína expresado en un cultivo celular para la conjugación es el siguiente. Cuando el medio de cultivo celular contiene cisteína, los aductos de disulfuro se pueden formar entre los aminoácidos de cisteína recién introducidos y la cisteína del medio. Estos aductos de cisteína, representado como un círculo en el ejemplo de TioMab, se deben reducir para generar anticuerpos manipulados genéticamente en cisteína reactivos para la conjugación. Los aductos de cisteína, presumiblemente junto con varios enlaces disulfuro intercatenarios, se escinden por reducción para dar una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tales como TCEP. Los enlaces disulfuro intercatenarios entre los residuos de cisteína apareados se vuelven a formar en condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA, o exposición al oxígeno del ambiente. Los residuos de cisteínas, manipulados genéticamente, y no apareados recién introducidos permanecen disponibles para la reacción con los reactivos ligadores o intermediarios fármaco-ligador para formar los conjugados del anticuerpo de la invención. Los TioMab expresados en las líneas celulares de mamíferos producen un aducto de Cys conjugado en forma externa con una Cys manipulada genéticamente a través de la formación de un enlace –S–S–. En consecuencia, los TioMab purificados se tratan con procedimientos de reducción y reoxidación para producir TioMab reactivos. Estos TioMab se usan para conjugarse con la maleimida que contienen los fármacos citotóxicos, fluoróforos y otras marcas.

10. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti–FcRH5 descriptos en la presente también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparar por los métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y WO97/38731 publicada ek 31 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación aumentado se describen en la Patente U.S. No. 5.013.556.

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

B. Ciertos métodos de preparar anticuerpos

1. Selección de anticuerpos anti–FcRH5 con las propiedades deseadas

Las técnicas para generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos de FcRH5 se han descripto anteriormente. También se puede seleccionar anticuerpos con determinadas características biológicas, según se desee.

Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención se pueden evaluar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido de FcRH5 ya sea en forma endógena o después de la transfección con el gen de FcRH. Por ejemplo, las líneas de células tumorales apropiadas y las células transfectadas con FcRH5 se pueden tratar con un anticuerpo anti–FcRH5 monoclonal de la invención en varias concentraciones durante pocos días (por ejemplo, 2–7) días y se tiñe con violeta de cristal o MTT o se analiza con algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medir proliferación puede ser la comparación de la captación de ^{3}H–timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención. Después del tratamiento, las células se recolectan y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar por varias maneras conocidas en la técnica. La célula tumoral puede ser una que sobreexpresa un polipéptido de FcRH5. El anticuerpo anti–FcRH5 inhibirá la proliferación celular de la célula tumoral que expresa FcRH5 *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25–100% en comparación con la célula tumoral no tratada, con más preferencia, en aproximadamente 30–100%, y aun con más preferencia en aproximadamente 50–100% o 70–100%, en una forma de realización, con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en un cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1–10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti–FcRH5 a aproximadamente 1 µg/kg a

aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce la reducción del tamaño tumoral o reducción de la proliferación de las células tumorales dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, con preferencia dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

Para seleccionar un anticuerpo anti–FcRH5 que induce muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de la membrana, indicada por ejemplo, por captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD respecto de un control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido de FcRH5 se incuba con medio solo o medio que contiene el anticuerpo anti–FcRH5 apropiado (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml). Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se alicuotan en tubos 12 x 75 tapados con filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los agregados celulares. Los tubos luego reciben el PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN® y softwarw FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti–FcRH5 que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinado por la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti–FcRH5 inductores de muerte celular.

Para identificar los anticuerpos que se unen a un epitope de un polipéptido de FcRH5 unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el que se describe en Anticuerpos, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo sitio o epitope que un anticuerpo anti–FcRH5 conocido. En forma alternativa o adicional, se puede realizar mapeo de epitopes por métodos conocidos en

la técnica. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar tal como por barrido de alanina, para identificar los residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por la unión con anticuerpos policlonales para asegurar el plegado apropiado. En un método diferente, los péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido de FcRH5 se pueden usar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epitope caracterizado o conocido.

2. Ciertos métodos para el análisis de bibliotecas

Los anticuerpos anti–FcRH5 de la invención se pueden obtener por medio de bibliotecas combinatorias para detectar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de métodos son conocidos en la técnica para generar bibliotecas de despliegue de fagos y analizar dichas bibliotecas para hallar anticuerpos que posean las características deseadas. Dichos métodos se describen en general en Hoogenboom et al. (2001) en Methods in Molecular Biology 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas formas de realización, en Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073–1093.

En principio, los clones del anticuerpo sintético se seleccionan por la identificación de las bibliotecas de fagos que contienen fagos que exhiben varios fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionado a la proteína de cubierta del fago. Tales bibliotecas de fagos se inmunopurifican por cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos de Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y de esta manera se separan de los clones no unidos de la genoteca. Los clones de unión luego se eluyen del antígeno y además se pueden enriquecer por ciclos adicionales adsorción/elución del antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se pueden obtener por el diseño de un procedimiento de detección del antígeno adecuado para seleccionar el clon del fago de

interés seguido por la construcción de un clon del anticuerpo anti–FcRH5 de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y las secuencias de la región constante adecuada (Fc) descripta en Kabat. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition NIH Publication 91–3242, Bethesda MD (1991), vols. 1–3.

En ciertas formas de realización, el dominio de unión antígeno de un anticuerpo está formado de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, uno de cada cadenas liviana (VL) y pesada (VH), las que presentan tres bucles hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar en forma funcional en el fago, ya sea tanto los fragmentos de cadena simple Fv (scFv) en los cuales las VH y VL están unidos en forma covalente mediante un péptido flexible corto como fragmentos de Fab, en los cuales cada uno de ellos están fusionados a un dominio constante e interactúan en forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente, los clones de fagos que codifican Fvsc y los clones de fagos que codifican Fab se menciona colectivamente como "clones de fagos de Fv " o "clones de Fv".

Los repertorios de los genes VH y VL se pueden clonar separadamente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que luego se pueden investigar para hallar clones de unión con el antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de las fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad con el inmunógeno sin el requisito de la construcción de hibridomas. Alternativamente, el repertorio inactivo se puede clonar para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos con una amplia variedad de antígenos no propios y propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas inactivas también se pueden también preparar sintéticamente

por clonación de los segmentos génicos V no reordenados de las células madre, y mediante los cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para obtener el reordenamiento in vitro como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En ciertas formas de realización, el fago filamentoso se usa para desplegar fragmentos de anticuerpos por fusión con la proteína de cubierta menor pIII. Los fragmentos del anticuerpo se pueden desplegar como fragmentos de Fv de cadena simple, en el cual los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena de polipéptidos por un polipéptido espaciador flexible, por ej., como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en el cual una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de una célula huésped bacteriana donde el ensamblaje de la estructura de la proteína de cubierta de Fab que se despliega sobre la superficie del fago por desplazamiento de las proteínas de cubierta de tipo salvaje, por ejemplo como se describe en Hoogenboom, et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133–4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos génicos del anticuerpo se obtienen de células inmunes recolectadas de seres humanos o animales. Si se desea que una biblioteca tenga una tendencia a favor de los clones de anti-FcRH5, el sujeto se inmuniza con FcRH5 para generar una respuesta de anticuerpos y las células del bazo y/o células B circulantes diferentes de los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recupera por la construcción de una biblioteca. En una forma realización preferida, una biblioteca de fragmentos génicos del anticuerpo humano con tendencia a favor de los clones de anti-FcRH5 se obtiene por la generación de una respuesta de anticuerpos anti-FcRH5 en ratones transgénicos que portan una matriz génica de inmunoglobulinas funcionales (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcional) d manera que la inmunización de FcRH5 origina

células B que producen anticuerpos humanos contra FcRH5. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe a continuación.

El enriquecimiento adicional de las poblaciones de células reactivas anti-FcRH5 se pueden obtener por medio de un procedimiento de selección adecuado para aislar células B que expresan anticuerpos unidos a membrana que específicos de FcRH5, por ej., por separación de células con cromatografía de afinidad por FcRH5 o adsorción de células para FcRH5 marcado con fluorocromo seguido por separación de células activadas por flujo (FACS)).

Alternativamente, el uso de las células del bazo y/o las células B u otros PBL de un donante no inmunizado proporcionan una mejor representación del repertorio de anticuerpos posible y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos mediante cualquiera de las especies animales (humana o no humana) en las que FcRH5 no es un antigénico. Para las bibliotecas que incorporan la construcción del gen del anticuerpo in vitro, se recolectan células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos del anticuerpo no reordenados. Las células inmune de interés se pueden obtener de una variedad de especies animales, tales como especie humana, ratón, rata, lagomorfos, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc,

Los ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables del anticuerpo (que incluye a los segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y amplifican. En el caso de las bibliotecas de VH y VL reordenadas, el ADN deseado se puede obtener por aislamiento del ADN genómico o ARNm de los linfocitos seguidos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores que se aparean a los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reordenados descriptos en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),* 86: 3833-3837 (1989), de este modo se preparan diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V

se pueden amplificar del ADNc y ADN genómico, con los cebadores posteriores en los extremos 5'del exón que codifica el dominio de V maduro y cebadores delanteros basados en el segmento J descripto en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al., Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar el ADNc, los cebadores posteriores también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones *et al., Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y cebadores delanteros de la región constante como se describe en Sastry *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),* 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, la degeneración se puede incorporar en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En ciertas formas de realización, la diversidad de biblioteca se maximiza por el uso de cebadores PCR dirigidos a cada familia del gen V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmune, por ej., como se describe en el método de Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al., Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, los sitios de restricción raros se pueden introducir en el cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o también por amplificación de PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al., Nature*, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reacomodados sintéticamente se pueden derivar in vitro de los segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos génicos de VH humanos han sido v clonados y secuenciados (informado en Tomlinson *et al., J. Mol. Biol.,* 227: 776-798 (1992)), y mapeados (informado en Matsuda *et al., Nature Genet.,* 3: 88-94 (1993), estos segmentos clonados (que incluyen a todos las conformaciones principales del bucle H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom

y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH se pueden preparar con toda la diversidad de secuencia centrada en un bucle H3 largo de una longitud única como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de Vκ y Vλ humanos han sido clonados y secuenciados (informados en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadena liviana sintéticos. Los repertorios sintéticos del gen V basados en una variedad de pliegues de VH y VL y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación del gen V que codifica ADN, los segmentos del gen V de la línea germinal se pueden reordenar in vitro de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381–388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpos se pueden construir por combinación de los repertorios de genes VH y VL juntos de diversas maneras. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes, y los vectores recombinados in vitro, por ej., como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), o in vivo por infección combinatoria, por ej., el sistema loxP descripto en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El método de recombinación *in vivo* explora la naturaleza de dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesta por la eficiencia de la transformación en *E. Coli.* Los repertorios VH y VL inactivos se clonan en forma separada, uno en un fagémido y el otro en un vector fago. Las dos bibliotecas luego se combinan por infección con el fago de la bacteria que contiene un fagémido de manera tal que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca está limitado solo por el número de células presente (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen in vivo señales de recombinación de manera que los genes de VH y VL se recombinen en un replicón único y se co-empaquen en viriones del fago. Estas bibliotecas enormes proporcionan cantidad es

grandes de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Alternativamente, los repertorios se pueden clonar en forma secuencial en el mismo vector, por ej., como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y luego clonarse, por ej., como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de PCR también se puede usar para unir los ADN de la VH y VL con el ADN que codifica un péptido espaciador flexible para formar repertorios de Fv de cadena simple (Fvsc). En aún otra técnica se usa el "ensamblaje por PCR de células" para combinar los genes de VH y VL en los linfocitos por PCR y se ligan los repertorios de clones de los genes como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por las bibliotecas inactivas (naturales o sintética) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración de afinidad también se puede mimetizar *in vitro* por la construcción y reselección de las bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo la mutación se puede introducir aleatoriamente in vitro por medio de la polimerasa predispuesta a error (informada en Leung *et al.*, *Technique,* 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.,* 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de afinidad se puede realizar por mutación aleatoria de una o más CDR, por ej., usando PCR con cebadores que portan una secuencia al azar que abarca el CDR de interés, en clones de FV individuales seleccionados y detección de clones de afinidad superior. WO 9607754 (publicada el 14 de marzo de 1996) describió un método para inducir la mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de la cadena liviana. Otro método efectivo es recombinar los dominios de VH o VL

seleccionados por el despliegue de fagos con repertorios de variantes del dominio V naturales obtenidas de dadores no inmunizados y se seleccionan por mayor afinidad en varias rondas de retransposición de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en el rango de 10^{-9} M o menos.

El análisis de las bibliotecas se puede obtener por varias técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se puede usar FcRH5 para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresar en las células huésped fijadas a las placas de por adsorción o usada en la separación celular o conjugada a biotina para la capturar con microesferas recubiertas con estreptavidina o se usan en otro método conocido en la técnica para la inmunopurificación de las bibliotecas de despliegue de fagos.

Las muestras de la biblioteca del fago se ponen en contacto con FcRH5 inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de por lo menos una porción de las partículas del fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para mimetizar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ej., como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ej., como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competición con el antígeno FcRH5, por ej., en un procedimiento similar al método de competición con el antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20-1.000-veces en una ronda única de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacteriales y posteriormente ser sujeto a selecciones.

La eficiencia de selección depende de muchos factores, que incluyen a las cinéticas de disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un fago único se pueden unir en forma simultánea con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación

rápida (y afinidades de unión débiles) pueden ser retenidos por medio de lavados cortos, despliegue de fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en la fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza al fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece que el fago que ha sido disociado se vuelva a unir. La selección de los anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se pueden promover por medio de lavados prolongados y despliegue de fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre los anticuerpos de fago de diferentes afinidades, aun con afinidades que difieren ligeramente, para FcRH5. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ej., como se realiza en alguna de las técnicas de maduración de afinidad descriptas anteriormente) es probable originar a muchos mutantes, la mayoría que se une al antígeno y unos pocos con alta afinidad. Con FcRH5 limitante, con poca frecuencia el fago de alta afinidad puedo ser superado. Para retener todas la mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con exceso de FcRH5 biotinilado, pero el FcRH5 biotinilado con una concentración de menor molaridad que la constante afinidad molar específica para FcRH5. Los fagos de alta afinidad de unión luego se pueden capturar por microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Tal "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos sean seleccionados de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de los clones mutantes con tan poco como una afinidad dos veces superior a partir de un gran exceso de fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas para el lavado de los fagos unidos a la fase sólida también se pueden manipular para discriminar sobre la base de la cinética de disociación.

Los clones anti-FcRH5 pueden ser de actividad selectiva. En ciertas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-FcRH5 que se unen a las células vivas que expresan naturalmente FcRH5. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-FcRH5 que bloquean la unión entre el ligando de FcRH5 y FcRH5, pero no bloquean la unión entre un ligando de FcRH5 y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a tales anticuerpos anti-FcRH5 se pueden seleccionar por (1) aislamiento de los clones anti-FcRH5 de una biblioteca de fagos como se describió anteriormente y opcionalmente amplificación de la población de clones del fago por crecimiento de la población en una huésped bacteriano adecuado, (2) seleccionar FcRH5 y una segunda proteína contra la cual se espera el bloqueo y no bloqueo de la actividad respectivamente (3) adsorber los clones del fago de anti-FcRH5 a FcRH5 inmovilizado, (4) usar un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier de los clones no deseados que reconocen los determinantes de unión a FcRH5 que se superponen o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína y (5) eluir los clones que permaneces adsorbidos después del paso (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer adicionalmente por la repetición de los procedimientos de selección descriptos en la presente memoria una o más veces.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados del hibridoma o despliegue de los fagos de los clones de Fv de la invención se aísla fácilmente y se secuencia mediante procedimientos convencionales (por ej., por uso de los cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificadoras de cadena pesada y liviana de interés proveniente del hibridoma o templado del ADN del fago). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego son transfectados en las células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células del ovario del

hámster chino (CHO), células de mieloma que de otra manera no producen proteínas de la inmunoglobulina, par obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica anticuerpos incluye Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, **5**: 256 (1993) y Pluckthun, Inmunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena liviana (por ej., las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, supra) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa o parcial. Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo se pueden usar para este propósito, que incluye a las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE y que tales regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) luego fusionado al ADN de la región constante de otra especie animal para forma las secuencia(s) codificadoras para la cadena pesada y/o liviana de longitud completa "híbrida", está incluido en la definición de anticuerpos "quimérico" e "híbrido" usada en la presente memoria. En ciertas formas de realización, un clon de Fv derivado del ADN variable humano se fusiona al ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificadoras para todas las cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa o parcial humanas.

El ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo por sustitución de la secuencia codificadora por las cadenas pesada y/o livianas de los dominios constantes en lugar de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon del hibridoma (por ej., como el método de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 6851-6855 (1984)). El ADN

que codifica un hibridoma o clon de Fv derivado del anticuerpo o fragmento se puede modificar adicionalmente por la unión en forma covalente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina total o parte de la secuencia codificadora del polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad del clon de Fv anticuerpo derivados del clon del hibridoma de la invención.

C. Terapia de profármacos medida por enzima dependiente del anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en ADEPT por la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (*por ejemplo* un agente quimioterapéutico peptidilo, ver WO 81/01145) en un fármaco anti-cáncer activo. Ver, por ejemplo, WO 88/07378 y patente U.S. No. 4.975.278.

El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de modo de convertirse en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero sin limitación, en fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, que son útiles para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, que es útil para convertir 5–fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti–cáncer, 5–fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D–alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D–aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos tales como β–galactosidasa y neuraminidasa, que son útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β–lactamasa, que es útil para convertir fármacos derivados con β–lactamas en fármacos

libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa y penicilina G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de aminas con grupos fenoxicetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. En forma alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocida en el arte como "abzimas" se pueden usar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (ver, *por ejemplo*, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados de anticuerpo y abzima se pueden preparar como se describe en la presente para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas anteriores se pueden unir en forma covalente a los anticuerpos anti–FcRH5 por las técnicas bien conocidas en el arte tal como el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncional descriptos anteriormente. En forma alternativa, las proteínas de fusión que comprenden al menos la unión a la región del antígeno del anticuerpo de la invención unida a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención se puede construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia (ver, *por ejemplo,* Neuberger et al., Nature 312:604–608 (1984).

D. Anticuerpo anti–FcRH5

Además de los anticuerpos anti–FcRH5 descriptos en la presente, está contemplado que se pueden preparar las variantes del anticuerpo anti–FcRH5. Las variantes del anticuerpo anti–FcRH5 se puede preparar por la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en ADN codificador y/o por la síntesis del anticuerpo deseado o polipéptido. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos pos-traduccionales del anticuerpo anti–FcRH5, tales como el cambio del número o posición de los sitios de glicosilación o alteración de las características de anclaje en de la membrana.

Las variaciones en los anticuerpos anti–FcRH5 descriptos en la presente, se pueden realizar, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservadoras y no conservadoras expuestas, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, supresión o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o polipéptido que originan un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti–FcRH5. La orientación para determinar qué residuo se puede insertar, sustituir o suprimir sin afectar adversamente la actividad deseada se puede hallar al comparar la secuencia del anticuerpo anti–FcRH5 con la de las moléculas de proteína y minimizar la cantidad de cambios de en la secuencia de aminoácidos realizados en las regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina con una serina, es decir, reemplazos conservadores de aminoácido. Las inserciones o supresiones opcionalmente pueden estar en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar por la realización sistemática de inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizar las variantes resultantes en cuanto a la actividad exhibida por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

Los fragmentos del anticuerpo anti–FcRH5 se proporcionan en la presente. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N–terminal o C–terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no

son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti–FcRH5.

Los fragmentos de anticuerpo anti–FcRH5 se pueden preparar por alguna de las numerosas técnicas convencionales. Los fragmentos del péptido deseados se pueden sintetizar químicamente. Un método alternativo involucra generar fragmentos del anticuerpo o polipéptido por digestión enzimática, por ejemplo, por el tratamiento de la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o por la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislamiento del fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada involucra el aislamiento y amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Con preferencia, los fragmentos de anticuerpo anti–FcRH5 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti–FcRH5 nativo que se describe en la presente.

En formas de realización particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 8 bajo el título de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, por lo tanto se introducen cambios más sustanciales, denominados ejemplos de sustituciones en la Tabla 8, o como se describe a continuación con referencia a las clases de aminoácidos y se analizan los productos.

Tabla 8

Residuo Original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val

Arg (R)	lys; gln; asn		lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg		gln
Asp (D)	glu		glu
Cys (C)	ser		ser
Gln (Q)	asn		asn
Glu (E)	asp		asp
Gly (G)	pro; ala		ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; orleucina		leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala		ala
Ser (S)	thr		thr
Thr (T)	ser		ser
Trp (W)	tyr; phe		tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu	

Se pueden obtener modificaciones sustanciales de la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti–FcRH5 por la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) la masa de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupo basados en las propiedades comunes de sus cadenas laterales

(1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílico neutro: cis, ser, thr;

(3) ácido: asp, glu;

(4) básico: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen la orientación de la cadena: gli, pro; y

(6) aromático: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambio un miembro de uno de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, con más preferencia, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis por casete [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis por selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para producir el ADN de la variante del anticuerpo anti–FcRH5.

También se puede emplear el análisis del barrido de aminoácido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se hallan los aminoácidos neutros y relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido de este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081–1085 (1989)]. Normalmente también se prefiere alanina porque es el aminoácido más común. Por otra parte, con frecuencia se halla sepultado y con las posiciones expuestas [Creighton,

The Proteins, (W.H. Libreman & Co., N.Y.); Chotia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades de variante adecuadas, se puede usar un aminoácido isotérico.

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti–FcRH5 también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo anti–FcRH5 para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución involucra sustituir una o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas con respecto al anticuerpo original del que se generan. Una forma conveniente para generar dichas variantes por sustitución involucra la maduración de afinidad usando despliegue en fago. En breves palabras, varios sitios de la región (*por ejemplo*, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se despliegan en forma monovalente a partir de las partículas del fago filamentoso como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes desplegadas en el fago luego se analizan para determinar su actividad biológica (*por ejemplo*, afinidad de unión) como se describe en la presente. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidata para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina) para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen en forma significativa a la unión del antígeno. En forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el

anticuerpo y el polipéptido de FcRH5. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de las variantes se somete a análisis usando las técnicas conocidas en la técnica, que incluyen las descriptas en la presente, y se pueden seleccionar las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti–FcRH5 se preparan por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes naturales de la secuencia de aminoácidos) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigido al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada antes o una versión no variante del anticuerpo

E. Modificaciones de anticuerpos anti–FcRH5

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti–FcRH5 se incluyen dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluyen la reacción de residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti–FcRH5 específicos con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N– o C– terminal del anticuerpo anti–FcRH5. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento del anticuerpo anti–FcRH5 a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para usar en el método para purificar anticuerpos anti–FcRH5, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1–bis(diazoacetil)–2–feniletano, glutaraldehído, ésteres de N–hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4–azidosalicílico, imidoésteres homobufuncionales que incluyen ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'–ditiobis(succinimidilpropionato),

maleimidas bifuncioanles tales como bis–N–maleimido–1,8–octano y agentes tales como metil–3–[(p–azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, metilación del grupo α–amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure y Molecular Properties, W.H. Libreman & Co., San Francisco, pp. 79–86 (1983)], acetilación de la amina N–terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C–terminal.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti–FcRH5 incluido dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido. Por "alterar el patrón de glicosilación nativo" se entiende para los fines de la presente la supresión de uno o más residuos de carbohidrato hallados en la secuencia nativa del anticuerpo anti–FcRH5 (sea por la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o por la supresión de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o agregado de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del anticuerpo anti–FcRH5. Además, la frase incluye los cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que involucran un cambio de la naturaleza y las proporciones de los diversos residuos de carbohidratos presentes.

La glicosilación de los anticuerpos está normalmente N-ligada u O-ligada. Los N-ligados se refieren a la unión del residuo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo la presencia de cualquiera de estas secuencias del tripéptido de un polipéptido origina un sitio de glicosilación potencial.

La glicosilación O-ligada se refiere a la unión de los azúcares de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de los sitios de glicosilación al anticuerpo anti–FcRH5 se logra en forma conveniente por la alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias del tripéptido descriptas anteriormente (para los sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también se puede realizar por la adición, o sustitución de uno o más residuos serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original ((para los sitios de glicosilación O-ligados). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti–FcRH5 opcionalmente se puede alterar a través de cambios en el nivel de ADN, en particular por la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 en bases preseleccionadas de modo que los codones que se generen se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de residuos de carbohidrato en el anticuerpo anti–FcRH5 es por acoplamiento químico o enzimático de los glicósidos para el polipéptido. Dichos métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicado el 11 de setiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259–306 (1981).

La eliminación de residuos de carbohidrato presentes en el anticuerpo anti–FcRH5 se puede lograr en forma enzimática o química o por substitución por la mutación de los codones que codifican los residuos de aminoácidos que sirven como blancos para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y by Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de residuos de carbohidrato en los polipéptidos se puede obtener por el uso de una variedad de endo– y exo–glicosidasas descriptas por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de de modificación covalente de los anticuerpos anti–FcRH5 comprende la unión del anticuerpo a una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera que se expone en las Patentes U.S. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. El anticuerpo también se puede capturar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edición, Oslo, A., Ed., (1980).

El anticuerpo anti–FcRH5 de la presente invención también se puede modificar de modo de formar moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti–FcRH5 fusionado a otra secuencia de polipéptidos o aminoácidos heterólogos.

En una forma de realización, dicha molécula quimérica comprende un anticuerpo anti–FcRH5 de fusión con un polipéptido marcado que proporciona un epitope al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti–marca. La marca del epitope generalmente se coloca en los extremos terminales amino– o carboxilo del anticuerpo anti–FcRH5. la presencia de dichas formas marcadas en el epitope del anticuerpo anti–FcRH5 se pueden detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido con marca. Asimismo, la provisión de la marca del epitope permite que el anticuerpo anti–FcRH5 sea purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca del epitope. Varios polipéptidos con marca y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen las marcas poli–histidina (poli–his) o poli–histidina–glicina (poli–his–gly); el polipéptido con marca HA flu y su anticuerpo 12CA5 [Field et

al., Mol. Cell. Biol., 8:2159–2165 (1988)]; la marca c–myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de estos [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610–3616 (1985)]; y la marca de glicoproteína D del virus Herpes Simplex (gD) y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547–553 (1990)]. Otros polipéptidos con marca incluyen el péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204–1210 (1988)]; el péptido del epitope KT3 [Martin et al., Science, 255:192–194 (1992)]; un péptido del epitope de α–tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163–15166 (1991)]; y la marca del péptido de la proteína 10 del gen T7 [Lutz–Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393–6397 (1990)].

En una forma de realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti–FcRH5 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser en la región de Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig con preferencia incluyen la incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio de transmembrana suprimido o inactivado) anticuerpo anti–FcRH5 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una forma de realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también patente US No. 5.428.130 presentada el 27 de junio de 1995.

F. Preparación of anticuerpos anti–FcRH5

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti–FcRH5 por el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-FcRH5. Obviamente, está contemplado que se pueden emplear métodos alternativos que son bien conocidos en la técnica, para preparar anticuerpos anti–FcRH5. Por ejemplo, la secuencia

de aminoácidos apropiada, o porciones de esta se pueden producir por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida [ver, por ejemplo, Stewart et al., Solid–Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Libreman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149–2154). La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) mediante las instrucciones del fabricante. Varias porciones del anticuerpo anti–FcRH5 se pueden sintetizar químicamente en forma separada y se combinan usando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti–FcRH5 deseado.

1. Aislamiento del ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5

El ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 se puede obtener de una biblioteca de ADNc preparada del tejido que se considera que posee el ARNm del anticuerpo anti–FcRH5 y lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, un ADN del anticuerpo anti–FcRH5 o polipéptido de FcRH5 humano se puede obtener de modo conveniente a partir de una biblioteca de ADNc preparada de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 también se puede obtener de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácido nucleico automatizada).

Las bibliotecas se pueden analizar con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20–80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por este. El análisis de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada se puede realizar usando procedimientos estándares, tales como los descriptos en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 es usar la metodología de PCR [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al.,

PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Las técnicas para analizar una biblioteca de ADNc son bien conocidas en la materia. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca de modo de minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido con preferencia se marca de modo que se pueda detectar después de la hibridación al ADN en la biblioteca analizada. Los métodos de marcación son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcas como ATP marcado con ^{32}P, biotinilación o marcación con enzimas. Las condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook et al., supra.

Las secuencias identificadas en tales métodos de análisis de biblioteca se pueden comparar y alienar con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en las bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (a nivel del aminoácido o nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente.

El ácido nucleico que tiene la secuencia codificadora de la proteína se puede obtener por el análisis de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas usando la secuencia de aminoácidos deducida descripta en la presente para la primera vez y, si es necesario, usando procedimientos de extensión de cebadores convencionales como se describe en Sambrook et al., supra, para detectar precursores y procesar los intermediarios de ARNm que no se transcribieron en forma inversa en cADN.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descriptos en la presente para la producción del

anticuerpo anti–FcRH5 y se cultivan en medio de nutrientes convencional modificado según corresponda para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secùencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por los profesionales expertos sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden hallar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., supra.

Los métodos de transfección de células eucarióticas y transformación de células procarióticas, que significan la introducción de ADN en el huésped de modo que el ADN sea replicable, sea como integrante extracromosómico o cromosómico, son comúnmente conocidos por los profesionales expertos, por ejemplo, $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediado por liposoma, polietilen–glicol/DMSO y electroporación. De acuerdo con la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándares apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook et al., supra, o la electroporación se usan generalmente para los procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células de plantas, como se describe en Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456–457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones en sistemas de células huésped de mamíferos que han descripto en la Patente U.S. No. 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el método de Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir ADN en las células, tales como por microinyección nuclear,

electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527–537 (1990) y Mansour et al., Nature, 336:348–352 (1988).

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores.

a. Células huésped procarióticas

Las células huésped procariotas adecuadas incluyen pero sin limitación arqueobacterias y eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están públicamente disponibles, tales como cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635). Otra células huésped procarióticas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurio*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, asçi como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descriptos en DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped progenitor particularmente preferido porque es la cepa huésped más común para las fermentaciones del producto de ADN recombinante. Con preferencia, la célula huésped secreta cantidad mínimas de enzima proteolítica. Por ejemplo, la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190–1219; ATCC Depósito No. 27,325) se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para

el huésped, los ejemplos de dichos huéspedes incluyen cepa W3110 de *E. coli* 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA* ; cepa W3110 de *E. coli* 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa W3110 de *E. coli* 27C7 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF–lac)169 degP ompT kan*^{r}; cepa W3110 de *E. coli* 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF–lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; cepa W3110 de *E. coli* 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación por supresión *degP* resistente a no kanamicina; cepa W3110 de *E. coli* 3D3 que tiene genotipo W3110 *ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc–fepE) degP41 kan*^{R} (U.S. Pat. No. 5.639.635) y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante que se describe en la Patente U.S. No. 4.946.783 presentada en agosto de 1990. Otras cepas y sus derivados, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*$_\lambda$ 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308(ATCC 31,608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y descriptos en, por ejemplo Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas que toman en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo las especies de E. coli, Serratia, o Salmonella se pueden usar adecuadamente como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente la célula huésped deberá secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y los inhibidores de proteasas adicionales se pueden incorporar en forma deseable al cultivo de células. Alternativamente, los métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos son adecuados.

Los anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, y las proteínas de fusión del anticuerpo se pueden producir en las bacterias,

en particular cuando no se necesitan glicosilación y función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (*por ejemplo*, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra efectividad en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tiene una vida media mayor en la circulación. La producción en E. coli es más rápida y más rentable. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y polipéptidos de las bacterias, ver, por ejemplo, U.S. 5.648.237 (Carter et. al.), U.S. 5.789.199 (Joly *et al.*), U.S. 5,840,523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, estas patentes se incorporan en la presente por referencia. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, *por ejemplo*, una columna de proteína A o G de acuerdo con el isotipo. La purificación final se pude llevar a cabo en forma similar al proceso para purificar anticuerpos expresados por ejemplo, en las células CHO.

b. Células huésped eucarióticas

Además de los procariotas, los microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el anticuerpo anti–FcRH5. *Saccharomyces cereevisia* es un microorganismo eucariótico inferior. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139,383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces,* (Patente U.S. No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968–975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98–8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737–742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); *Pichia*

pastoris (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265–278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259–5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 publicado 31 October 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillio, Tolypocladio* (WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284–289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205–221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470–1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475–479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en la presente e incluyen, pero sin limitación, levaduras capaces de crecimiento en metanol seleccionado del género que consiste en *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis,* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede hallar en C. Anthony, The Biochemistry of of Methylotrophs, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti–FcRH5 glicosilado derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de insecto tales como Drosophila S2 y Spodoptera Sf9, así como las células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate, y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales que corresponden a célula huésped de insecto permisivas tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles al público, *por ejemplo*, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar como el virus de la presente de acuerdo con la presente

invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo el interés ha sido mayor en las células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo celular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de las líneas celulares de células huésped de mamíferos son la línea CV1 del riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)), células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata búfalos (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células de hígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)), células MRC 5, células FS4 y una línea celular de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descriptos para la producción del anticuerpo anti–FcRH5 y se cultivan en un medio nutriente convencional modificado como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable Vector

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que lo codifica se aisla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el

anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, por medio de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped usada. En general, se prefiere las células huésped de origen procariótico o eucariótico (generalmente de mamífero).

El vector, por ejemplo, puede estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector por una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio de restricción de endonucleasa apropiado usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento que son conocidas por los profesionales expertos.

El FcRH5 se puede producir en forma recombinante no solo en directamente sino también como polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariótica seleccionada por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o líderes de enterotoxina II termoestables. En la secreción de levaduras la secuencia señal nativa se pueden sustituir, *por ejemplo,* con una líder de invertasa de levaduras, líder del factor α (líderes que incluyen el factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, está última descripta en la Patente U.S. No. 5.010.182), o

líder de fosfatasa ácida, líder de glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362,179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descripta en WO 90/13646 publicado el 15 noviembre de 1990. En la expresión de la célula de mamífero, las secuencias señal de mamíferos se pueden usar para dirigir la expresión de la proteína, tal como las secuencias señal de los polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, así como líderes secretores virales.

a. Células huésped procarióticas

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos de los anticuerpos de la invención se pueden obtener mediante técnicas recombinantes estándares. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de las células productoras de anticuerpos tales como las células del hibridoma. En forma alternativa, los polinucleótidos se pueden sintetizar mediante el sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar los polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica se pueden usar para los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y la célula huésped particular que se transformará con el vector. Cada vector contiene varios componentes, que dependen de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside.

En general, los vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias control que derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas, así como secuencias marcadoras que son capaces de

proporcionar la selección fenotípica de las células transformadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322, que contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y y de este modo proporciona un medio sencillo para la identificación de las células transformadas, es adecuado para la mayor parte de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. pBR322, sus derivados u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos también pueden contener, o ser modificados para contener, promotores que se pueden usar con organismos microbianos para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter et al., patente US No. 5.648.237.

Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias control que son compatibles con el organismo huésped se pueden usar como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar el bacteriófago tal como λGEM.TM.–11 para preparar un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped sensibles tal como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia regulatoria no traducida ubicada corriente arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos normalmente son de dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que induce altos niveles de transcripción del cistrón bajo su control como respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo en presencia o ausencia de un nutriente o cambio de temperatura.

Se conocen numerosos promotores reconocidos por una variedad de potenciales células huésped. El promotor seleccionado puede estar unido operativamente al ADN del cistrón que codifica la cadena liviana o pesada por la eliminación del promotor de la fuente de ADN por medio de la digestión con una enzima de restricción y la inserción de la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Se pueden usar tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos para la amplificación y/o expresión directa de los genes blanco. En algunas formas de realización, se utilizan promotores heterólogos, ya que ellos en general permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen blanco expresado en comparación con el promotor del polipéptido blanco.

Los promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores β-galactamasa y lactosa, [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776] y y promotores híbridos tales como el promotor tac (trp) [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21–25 (1983)] o el promotor *trc*. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine–Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en las bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos) son también adecuados. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, de este modo permiten que un profesional experto las ligue en forma operativa a los cistrones que codifican las cadenas livianas y pesadas blanco (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) empleando ligadores o adaptadores para aportar algunos de los sitios de restricción requeridos.

En un aspecto de la invención, cada cistrón del vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de

secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido blanco que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención deberá ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas en los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo del grupo que consiste en secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de las misma.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención se puede producir en el citoplasma de la célula huésped y por consiguiente no requiere la presencia de las secuencias señal de secreción en cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas livianas y pesadas de la inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ej., las cepas de E. coli trxB) proporcionan condiciones citoplásmicas que son favorables para la formación del enlace disulfuro, de este modo se permite el plegamiento apropiado y el ensamblaje de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

La presente invención proporciona un sistema de expresión en que la relación cuantitativa de los componentes del polipéptido expresados se puede modular a fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos de la invención secretados y ensamblados apropiadamente. Dicha modulación se obtiene al menos en parte por la modulación

simultánea de las potencias de traducción para los componentes del polipéptido.

Una técnica para la modulación de las potencias de traducción se describe en Simmons et al., patente US No. 5.840.523. Esta utiliza las variantes de la región de iniciación de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos con una variedad de potencias de traducción, de este modo se proporciona un medio conveniente por el cual se ajusta este factor para el nivel de expresión deseada de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar por técnicas de mutagénesis convencionales que producen cambios en el codón que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, si bien se prefieren cambios silentes en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones de la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en la cantidad o espaciado de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con las alteraciones de la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" en el comienzo de una secuencia codificadora que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silentes). Esto se puede obtener por el cambio de la tercera posición de nucleótido de cada codón; en forma adicional, algunos aminoácidos, tal como leucina, serina, y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden agregar complejidad a la preparación del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Con preferencia, se genera un conjunto de vectores con una variedad de potencias de TIR para cada cistrón de ella. Este conjunto limitado proporciona una comparación con los niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados en varias combinaciones de potencia de TIR. Las potencias de TIR se pueden determinar por la cuantificación del nivel de expresión de

un gen indicador como se describe en detalle en Simmons et al. Patente US No. 5. 840.523. Sobre la base de la comparación de la potencia de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en los constructos del vector de expresión de la invención.

b. Células huésped eucarióticas

Los componentes del vector en general incluyen pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

(1) Componente de la secuencia señal

Un vector para uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada con preferencia es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de la célula de mamífero, las secuencias señal de mamífero así como las líderes secretoras virales, por ejemplo la señal gD del herpes simplex, están disponibles.

El ADN para tal región precursora se une en el marco de lectura para el ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen de replicación

Generalmente, el componente del origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede usar normalmente solo porque contiene el promotor temprano.

(3) Selección del componente génico

Los vectores de expresión y clonación normalmente pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ej., ampicilina,

neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, o (c) aporte de nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, *por ejemplo,* el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli.*

Un ejemplo de un esquema de selección usa un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Estas células que se transforman con éxito con gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y de este modo sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Un ejemplo de marcador seleccionable adecuado para las células de mamífero son las que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-FcRH5, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, con preferencia los genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, *etc.* Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente de la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL–9096), preparada y propagada como se describe en Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR primero se identifican por el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Alternativamente, se pueden seleccionar las células huésped (particularmente los huésped de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo, proteína DHFR tipo salvaje y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por cultivo celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal

como un antibiótico aminoglucosídico, por ej., kanamicina, neomicina o G418. Ver patente US No. 4.965.199.

Un gen de selección para usar en levaduras es el gen *trp*1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al., Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp*1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptofano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

(4) Componente del promotor

Los vectores de expresión y clonación usualmente pueden contener un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 para dirigie la síntesis de ARNm. Son bien conocidos los promotores reconocidos por una variedad de potenciales células huésped.

Virtualmente todos los genes de eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se halla de 70 a 80 bases corriente arriba del comienzo de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos es una secuencia AATAAA que puede ser una señal para la adición de la cola poliA del extremo 3' de la secuencia codificadora. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariotas,

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar en huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3–fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfo-fructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa,

piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

La transcripción del anticuerpo anti–FcRH5 de los vectores de las células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de viruela aviar (UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y virus Simian 40 (SV40), de los promotores heterólogos de mamíferos, por ej., el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina de los promotores termoestables, de manera que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen de forma conveniente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en mamíferos huésped que usan el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la Patente U.S. No. 4.419.446. Una modificaron de este sistema se describe en la Patente U.S. No. 4.601.978. Ver también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un

promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex. En forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(5) Componente del elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el anticuerpo anti–FcRH5 por eucariotas superiores con frecuencia aumenta por la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN de acción cis, usualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias potenciadoras son actualmente conocidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de una célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en la parte última del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en la parte última del origen de replicación y potenciadores del adenovirus. Ver también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de los promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el anticuerpo anti–FcRH5, pero con preferencia se localiza en el sitio 5' del promotor.

(6) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas (de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y la estabilización del ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de los ADN eucariotas o virales o los ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcriptos como fragmentos poliadenilados de la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo anti–

FcRH5. Un componente de terminación de transcripción es la región de poliadenilación de la hormona crecimiento bovina. Ver WO94/11026 y el vector de expresión allí descripto.

Otros métodos, vectores y células huésped adecuadas para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti–FcRH5 en un cultivo celular de vertebrado recombinante se describen en Gething et al., Nature, 293:620–625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40–46 (1979); EP 117.060; y EP 117.058.

4. Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti–FcRH5 de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios.

a. Células huésped procarióticas

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y son adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB) más suplementos nutricionales necesarios. En algunas formas de realización, el medio también contiene un agente de selección, elegido sobre la base de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de las células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo se agrega ampicilina al medio para el crecimiento de las células que expresan el gen resistente a ampicilina.

Cualquiera de los suplementos necesarios además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico también se pueden incluir en concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla de otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de la E. coli, por ejemplo la temperatura

preferida varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, con más preferencia de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, aun con más preferencia a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varia de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para la E. coli, el pH es con preferencia de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y con más preferencia de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores de PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitado en fosfato para la inducción. Con preferencia, el medio limitado en fosfato es el medio C.R.A.P (ver, por ej., Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Se puede usar una variedad de otros inductores, de acuerdo con la construcción del vector empleado, como es conocido en el arte.

En una forma de realización, los polipéptidos de la presente invención se secretan y recuperan del periplasma de la célula huésped. La recuperación de la proteína típicamente involucra la ruptura del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, irradiación con ultrasonido o lisis. Una vez que las células se rompieron, los desechos celulares o células completas se pueden eliminar por centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo por cromatografía de afinidad en resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislar del mismo. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se filtra y concentra para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar adicionalmente e identificar mediante métodos comúnmente

conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

En un aspecto de la invención, la producción del anticuerpo se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procesos de fermentación discontinuos en gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen por lo menos 1000 litros de capacidad, con preferencia de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan un agitador de paletas para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación en pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que es de no más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

Durante el proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas típicamente se inicia después de que las células se han cultivado en condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ej., una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en tal etapa las células están en fase estacionaria temprana. Se pueden usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción del vector empleado, como se conoce en la técnica y se describió anteriormente. Las células se pueden cultivar durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen usualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más prolongado o más corto.

Para mejorar el rendimiento de la producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo para mejorar el ensamblaje apropiado y el plegado de los polipéptidos del anticuerpo secretado, se pueden usar vectores adicionales para sobreexpresar las proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para co-

transformar las células huésped procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegado apropiado y la solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en las células huésped bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente US No. 6.083.715; Georgiou et al., patente US No. 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son sensibles a la proteólisis), se pueden usar ciertas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo las cepas de la célula huésped se pueden modificar para efectuar las mutaciones genéticas de los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y sus combinaciones. Algunas de las cepas de E. coli deficientes en proteasa están disponibles y descriptas en, por ejemplo Joly et al. (1998), supra, Georgiou et al., patente US No. 5.264.365, Georgiou et al., patente US No. 5.508.192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una forma de realización, las cepas de E. coli deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan con una o más proteínas chaperonas se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

b. Células huésped eucarióticas

Los medios disponibles en el mercado tal como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células huésped. Además, cualquiera de los medios descriptos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patentes U.S. Nos. 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, o 5.122.469, WO 90/03430, WO 87/00195, o

Patente U.S. Re. 30.985 se puede usar como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar cuando fuera necesario con hormonas y/ otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), buffer (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMICINA™, oligoelementos (definidos como compuestos orgánicos usualmente presentes en concentraciones finales de rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede incluir también en concentraciones apropiadas que deben ser conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las que se usan previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidente para el profesional experto.

5. Detección de la amplificación/expresión del gen

La amplificación y/o expresión del gen se puede medir en una muestra en forma directa, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201–5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, sobre la base de las secuencias provistas en la presente. Alternativamente, se pueden emplear los anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, que incluyen los dúplex de ADN, dúplex de ARN y los dúplex híbridos de ADN–ARN o dúplex de ADN–proteína. Los anticuerpos a su vez se puede marcar y el ensayo se puede realizar cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que se puede detectar la formación de dúplex en la superficie, la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

La expresión génica se puede medir en forma alternativa por métodos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de las

células o secciones de tejido y el ensayo del cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonal o policlonal, y se puede preparar en cualquier mamífero. En forma conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido de FcRH5 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN provistas en la presente o contra una secuencia exógena fusionada al ADN de FcRH5 y que codifica un epitope del anticuerpo específico.

6. Purificación del anticuerpo anti–FcRH5

Las formas del anticuerpo anti–FcRH5 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de la célula huésped. Si está unido a membrana se puede liberar de la membrana usando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton–X 100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anticuerpo anti–FcRH5 se pueden alterar por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclo de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes de lisado celular.

Se puede desear purificar el anticuerpo anti–FcRH5 de las proteína o polipéptidos de la célula recombinante. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía en sílice en resina de intercambio catiónico tales como DEAE; cromatoenfoque; SDS–PAGE; precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G–75; columnas de sefarosa de proteína para extraer contaminantes tales como IgG; y columnas de quelantes de metales para unir formas marcadas en el epitope del anticuerpo anti–FcRH5. Varios métodos de purificación de proteínas se pueden emplear y tales métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification:

Principles and Practice, Springer–Verlag, New York (1982). La etapa de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado el anticuerpo anti–FcRH5 particular producido.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir en forma intracelular en el espacio periplásmico o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se en forma intracelular, como un primer paso, los desechos particulados, de las células huésped o fragmentos lisados se eliminan por ejemplo por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al., Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli.* En breves palabras, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando los anticuerpos se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero mediante un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF se puede incluir en cualquiera de los pasos precedentes para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición del anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar mediante por ejemplo cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, la técnica de purificación preferida es la cromatografía de afinidad. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies e isotipos de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar los anticuerpos basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos

los isotipos de ratón y para γ3 humanos (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivilnil)benceno permiten los caudales de flujo mas rápidos y los tiempos de procesamiento más cortos que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH_3m, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la para la purificación de proteína tal como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™ cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de los pasos de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo mediante un buffer de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, con preferencia se realiza a concentraciones de sal baja (por ej., sal de aproximadamente 0-0,25M).

G. Formulaciones farmacéuticas

El conjugado de anticuerpo y fármacos (ADC) de la invención se puede administrar por cualquier vía apropiada para la enfermedad tratada. El ADC normalmente se administrará en forma parenteral, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

Para tratar estos cánceres, en una forma de realización, el conjugado de anticuerpo y fármaco se administra por medio de infusión intravenosa. La dosis administrada por medio de infusión está en el rango

de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 10.000 $\mu g/m^2$ por dosis, en general una dosis por semana durante un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el rango de dosis es de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 1000 $\mu g/m^2$, aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 800 $\mu g/m^2$, aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 600 $\mu g/m^2$, aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 400 $\mu g/m^2$, aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 500 $\mu g/m^2$, aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 300 $\mu g/m^2$, aproximadamente 10 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 200 $\mu g/m^2$, y aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 200 $\mu g/m^2$. La dosis se puede administrar una vez por día, una vez por semana, múltiples veces por semana, pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por semana, una vez por mes o en forma intermitente para aliviar o reducir en forma intermitente los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos descriptos hasta la remisión del tumor o síntomas del linfoma, leucemia tratados. La administración puede continuar después de lograr que la remisión o alivio sea prolongada por dicha administración continuada.

La invención también proporciona un método de alivio de una enfermedad autoinmune, que comprende administrar a un paciente que sufre de la enfermedad autoinmune, una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo 10A8 humanizado–fármaco de cualquiera de las formas de realización precedentes. En formas de realización preferidas el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea. El conjugado de anticuerpo y fármaco se administra por vía intravenosa a una dosis en el rango de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 100 mg/ m^2 por dosis y en una forma de realización específica, la dosis es 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 500 $\mu g/m^2$. La dosis se puede administrar una vez por día, una vez por semana, múltiples

veces por semana, pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por día, múltiples veces por mes pero menos de una vez por semana, una vez por mes o en forma intermitente para aliviar o reducir en forma intermitente los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos descriptos hasta el alivio o reducción de los síntomas de la enfermedad autoinmune tratada. La administración puede continuar después de lograr alivio o reducción de los síntomas de modo que tal remisión o alivio sea prolongado por dicha administración continuada

La invención también proporciona un método de tratar un trastorno de las células B que comprende administrar a un paciente que sufre de un trastorno de las células B, tales como un trastorno proliferativo de las células B (que incluye sin limitación linfoma y leucemia) o una enfermedad autoinmune, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo 10A8 humanizado de cualquiera de las formas de realización precedentes, dicho anticuerpo no está conjugado a una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo se administrará normalmente en un rango de dosis de aproximadamente 1 $\mu g/m^2$ a aproximadamente 1000 mg/m^2.

En un aspecto, la invención además proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención y/o al menos un inmunoconjugado de este y/o al menos un conjugado de anticuerpo anti–FcRH5 y fármaco de la invención. En algunas formas de realización, a formulación farmacéutica comprende (1) un anticuerpo de la invención y/o un inmunoconjugado de este, y (2) a portador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, a formulación farmacéutica comprende (1) un anticuerpo de la invención y/o un inmunoconjugado de este, y opcionalmente, (2) al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación, los que se describen a continuación. El ADC

se administrará normalmente por vía parenteral, es decir, infusión, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural.

Las formulaciones terapéuticas (por ejemplo, que comprenden un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de FcRH5) se usa de acuerdo con la presente invención se preparar por el almacenamiento por la mezcla del ingrediente activo (por ejemplo, el anticuerpo o inmunoconjugado), que tiene el grado de pureza deseado con opcionales portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los recipientes a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen a los buffers tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol), polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, tonificantes trehalosa y cloruro de sodio, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, tensioactivo tal como polisorbato, contraiones formadores de sal tales como sodio complejos metálicos (por ej., complejos Zn-proteínas), y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Opcionalmente, pero con preferencia, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, con preferencia cloruro de sodio, y con

preferencia en aproximadamente concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización la concentración de conservante varía de 0,1 a 2,0%, normalmente v/v. Los conservantes adecuadso incluyen los conocidos en la técnica farmacéutica. Los conservantes preferidos son alcohol bencílico, fenol, m–cresol, metilparabeno, y propilparabeno. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02%.

Las formulaciones farmacéuticas usadas para la administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se logra por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las formulaciones en la presente también pueden contener más de un compuesto activo, si es necesario, para la indicación particular tratada, con preferencia aquellos con actividades complementarias no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti–FcRH5, puede ser deseable incluir en una formulación, un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti–FcRH5 que se une a un epitope diferente en el polipéptido de FcRH5, o un anticuerpo para algún otro blanco tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del cáncer particular. En forma alternativa o adicional, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación con cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos también se pueden capturar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de

fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, tales matrices están en forma de artículos moldeados, *por ej.*, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilácticos (Patente U.S. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímero de ácido láctico-ácido glicólico degradable tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas del copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permite la administración de moléculas durante más de 100 días, ciertas proteínas de liberación de hidrogeles durante períodos más cortos. Cuando la inmunoglobulina encapsulada permanece en el cuerpo por un tiempo prolongado, se puede desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que produce una pérdida de actividad biológica y cambios posibles en la inmunogenicidad. Se pueden concebir estrategias racionales para la estabilización que depende del mecanismo involucrado. Por ejemplo si se descubre que mecanismo de agregación es la formación de enlaces intermoleculares de S-S a través del intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización por la modificación de los residuos sulfhifrilo, liofilización de las soluciones ácidas, control del contenido de humedad, mediante aditivos apropiados y desarrollo de composiciones de la matriz del polímero específico.

Un anticuerpo se puede formular en cualquier forma adecuada para la administración a una célula/tejido blanco. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden formular como inmunoliposomas. Una "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es de utilidad para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparar por métodos conocidos en la técnica, tales como se describen en Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con aumento del tiempo de circulación se describen en la Patente U.S. No. 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG–PE), se extruden mediante filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286–288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico opcionalmente está contenido dentro del liposoma. Ver Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

Las formulaciones usadas para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas estériles.

H. Tratamiento con anticuerpos anti–FcRH5

Para determinar la expresión de FcRH5 en el cáncer, se dispone de varios ensayos de detección. En una forma de realización, la

sobreexpresión del polipéptido de FcRH5 se puede analizar por inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido incluidas en parafina provenientes de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo de IHC y los criterios de intensidad de tinción de una proteína de FcRH5 son los siguientes:

Puntuación 0 – no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos de 10% de las células tumorales.

Puntuación 1+ – se detecta una tinción de membrana débil/ligeramente perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células solo están teñidas en parte de su membrana.

Puntuación 2+ – se observa tinción de membrana completa débil a moderadamente en más de 10% de las células tumorales.

Puntuación 3+ – se observa tinción de membrana completa moderada a intensa en más de 10% de las células tumorales.

Estos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para el polipéptido de expresión de FcRH5 se pueden caracterizar como que no sobreexpresan FcRH5, mientras que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ se pueden caracterizar como que sobreexpresan FcRH5.

En forma alternativa o adicional, se pueden realizar los ensayo FISH tales como INFORM® (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) sobre tejido tumoral incluido en parafina y fijado en formalina para determinar el grado (si hubiera) de sobreexpresión de FcRH5 en el tumor.

La sobreexpresión o amplificación de FcRH5 se puede evaluar usando un ensayo de detección *in vivo*, por ejemplo, por la administración de una molécula (tal como un anticuerpo) que une la molécula que se detecta y se marca con una marca detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o una marca fluorescente) y barrido externo del paciente para la localización de la marca.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti–FcRH5 de la invención tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos

anti–FcRH5 de la presente invención puede ser útil para clasificar los cánceres que expresan el polipéptido de FcRH5 (por ejemplo, en radioimagen). Los anticuerpos también son útiles para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido de FcRH5 de las células, para la detección y la cuantificación del polipéptido de FcRH5 *in vitro*, por ejemplo, en una ELISA o una transferencia Western, para destruir y eliminar células que expresan FcRH5 a partir de una población de células mixtas como una etapa de la purificación de otras células.

En la actualidad, según la etapa del cáncer, tratamiento del cáncer involucra una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para extirpar el tejido canceroso, terapia de radiación, y quimioterapia. La terapia del anticuerpo anti–FcRH5 puede ser especialmente deseable en pacientes de edad avanzada que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedades metastásicas donde la terapia de radiación ha limitado la utilidad. Los anticuerpos anti–FcRH5 de la invención dirigidos al tumor son útiles para aliviar los cánceres que expresan FcRH5 después del diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti–FcRH5 se puede usar solo, o en combinación terapia, por ejemplo, con hormonas, antiangiogénos o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia. El tratamiento con el anticuerpo anti–FcRH5 se puede administrar en conjunto con otras formas de terapia convencional, ya sea en forma consecutiva, pre o pos–terapia convencional. Los fármacos quimioterapéuticos como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (palictaxel), estramustina y mitoxantrona se usan para tratar cáncer, en particular, en pacientes con riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, se puede administrar al paciente con cáncer anticuerpo anti–FcRH5 en conjunto con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos precedentes. En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, EP0600517). El

anticuerpo anti–FcRH5 se administrará con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, el anticuerpo anti–FcRH5 se administra en conjunto con la quimioterapia para aumentar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. El Physicians' Desk Reference (PDR) describe las dosis de estos agentes en el tratamiento de varios cánceres. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente efectivos dependerán del cáncer particular tratado, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para el médico experto en la materia y pueden ser determinada por el médico.

En una forma de realización particular, se administra un conjugado que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 conjugado con un agente citotóxico al paciente. Con preferencia, el inmunoconjugado unido la proteína de FcRH5 es incorporado por la célula, lo que origina aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado para destruir la célula cancerosa a la que se une. En una forma de realización preferida, el agente citotóxico se dirige o interfiere en el ácido nucleico de la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos se describieron anteriormente e incluyen maytansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

Los agentes terapéuticos de la presente invención (por ejemplo, anticuerpos anti–FcRH5 o sus conjugados a toxinas) se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa por ejemplo,, en forma de bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerobroespinal, subcutáneas, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración del agente terapéutico intravenosa o subcutánea.

Una estrategia *ex vivo* también se puede usar para las aplicaciones terapéuticas. Las estrategias ex vivo involucran transfectar o transducir

las células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de FcRH5. Las células transfectadas o transducidas luego vuelven al sujeto. Las células pueden ser de cualquier variedad de clases que incluyen, sin limitación, células hempoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T, o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, o células del músculo.

Por ejemplo, si el antagonista de FcRH5 es un anticuerpo o inmunoconjugado, el antagonista se administra por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista se administra adecuadamente por infusión por pulso, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. Con preferencia la dosis se administra por inyecciones, con máxima preferencia inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo que depende en parte si la administración es breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista de FcRH5 se administra en forma local, por ejemplo, por inyecciones directas, cuando el trastorno o ubicación del tumor lo permite, y las inyecciones se pueden repetir periódicamente. El antagonista de FcRH5 también se puede administrar en forma sistémica al sujeto o directa a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o un lecho del tumor después de la extirpación quirúrgica del tumor, a fin de prevenir o reducir la recurrencia o metástasis local.

La administración de los agentes terapéuticos en combinación normalmente se realiza durante un período de tiempo definido (usualmente minutos, horas, días o semanas según la combinación seleccionada). La terapia de combinación abarca la administración de estos agentes terapéuticos en forma secuencial, es decir, en donde cada

agente terapéutico se administra en tiempo diferente, así como administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, en forma sustancialmente simultánea.

El agente terapéutico se puede administrar por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo anti–FcRH o inmunoconjugado en la combinación se puede administrar por inyección intravenosa mientras que un agente quimioterapéutico de la combinación se puede administrar por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos se puedes administrar por vía oral, o ambos agentes terapéuticos se pueden administrar por inyección intravenosa, según los agentes terapéuticos específicos. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran también varía de acuerdo con los genes específicos.

De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de cada agente terapéutico es una dosis de candidato inicial para la administración al paciente, sea por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, de acuerdo con la enfermedad, el tratamiento es sostenido hasta que se trata el cáncer, medido por los métodos descriptos anteriormente. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles.

La presente solicitud contempla la administración del anticuerpo anti–FcRH5 por terapia génica. Ver, por ejemplo, WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996, que trata de uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Otros regimenes terapéuticos se pueden combinar con la administración del anticuerpo anti–FcRH5. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier

orden, en donde con preferencia hay un período de tiempo mientras ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Con preferencia dicha terapia combinada produce un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser conveniente combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti–FcRH5, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado con el cáncer particular.

En otra forma de realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención involucran la administración combinada de un anticuerpo anti–FcRH5 (o anticuerpos), y uno o más agente quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluye la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos, u otros agentes citotóxicos u otros agentes terapéuticos que también inhibe el crecimiento tumoral. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5–fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxiurea y hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y los esquemas de dosis para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o determinado en forma empírica por el profesional experto. La preparación y los esquemas de dosis para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti–hormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno; una anti–progesterona tal como onapristona (ver, EP 616 812); o un anti–andrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer tratado en cáncer independiente de andrógeno, el paciente pueden haberse sometido previamente a terapia anti–andrógeno y después el cáncer se vuelve independiente de

andrógeno, el anticuerpo anti–FcRH5 (y opcionalmente otros agentes descriptos en la presente) se pueden administrar al paciente.

Algunas veces, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a la extirpación quirúrgica de las células cancerosas y/o terapia de radiación (por ejemplo irradiación de rayos externa o terapia con un agente marcado radiactivo, tal como un anticuerpo), antes, en forma simultánea o pos-terapia con el anticuerpo. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son los que se usan en la presente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti–FcRH5.

La composición de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará y administrará de modo compatible con la buena práctica médica. Los factores en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. El anticuerpo no necesita, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados habitualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descriptos anteriormente. En general estos se usan en las mismas dosis y con las vías de administración usadas en la presente con anterioridad o aproximadamente de 1 a 99% de la dosis empleada antes en la presente.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación y modo de administración serán seleccionados por el médico de acuerdo con los criterios conocidos. La dosis apropiada de un anticuerpo de la

invención dependerá del tipo de enfermedad tratada, como se describió anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, antecedentes clínicos del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico asistente. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Con preferencia, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyecciones subcutáneas. De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (*por ej.*, 0,1–15mg/kg/dosis) del anticuerpo puede ser una dosis inicial a candidata para la administración al paciente, sea, por ejemplo por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti–FcRH5. Sin embargo, otros regimenes de dosificación pueden ser útiles. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, según la afección, el tratamiento se sostiene hasta se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede controlar rápidamente por métodos y ensayos convencionales basados en los criterios conocidos por los médicos u otros expertos en la materia.

Además de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración del ácido nucleico que codifica el anticuerpo está abarcada por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo". Ver, por ejemplo, WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 respecto del uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos métodos principales para obtener el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, usualmente en el sitio donde se requiere anticuerpo. En el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente en forma directa o por ejemplo, se encapsulan en membranas porosas que se implantan en el paciente (ver, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en las células viables. Las técnicas varían de acuerdo con si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en la células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico en las células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE–dextrano, método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del Herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC–Chol). Para la revisión de los protocolos de marcación del gen y terapia génica comúnmente conocidos ver Anderson et al., Science 256:808–813 (1992). Ver también WO 93/25673 y las referencias allí citadas.

Los anticuerpos anti–FcRH5 de la invención pueden estar en las diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpo" en la presente. En consecuencia, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacto, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo o variantes de aminoácido de secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de

estos. En los anticuerpos de fusión una secuencia de anticuerpo se fusiona a una secuencia de polipéptido heteróloga. Los anticuerpos se pueden modificar en la región de Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Como se describe con más detalle en las secciones en la presente, con las regiones de Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido sobre la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, por medio de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) o por reclutamiento del complemento en la citotoxicidad mediada por complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, cuando sea conveniente eliminar o reducir la función efectora, para minimizar los efectos secundarios o complicaciones terapéuticas, se pueden usar otras regiones de Fc.

En una forma de realización, el anticuerpo compite por la unión o une sustancialmente al mismo epitope que los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos que tienen las características biológicas de los presentes anticuerpos anti–FcRH5 de la invención también están contemplados, específicamente que incluyen el direccionamiento al tumor *in vivo* y cualquiera de inhibición de la proliferación celular o las características citotóxicas.

Los métodos de producir los anteriores anticuerpos se describen en detalle en la presente.

Los presentes anticuerpos anti–FcRH5 son útiles para tratar un cáncer que expresa FcRH5 o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dichos cáncer incluye, pero son limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o neoplasias linfoides, pero también los cánceres del bazo y cánceres de los ganglios linfáticos. Los ejemplos más particulares de tales cánceres asociados con las células B, incluyen por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (que incluyen Linfomas de células B tales como, por ejemplo, linfoma de células B del tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma no Hodgkin, linfoma de células del

manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, y linfoma de Hodgkin y linfoma de células T) y leucemias (que incluye leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, tales como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tales como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tales como leucemia linfoblástica aguda y mielodisplasia), y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o T. Los cánceres abarcan cánceres metastáticos de cualquiera de los precedentes. El anticuerpo se puede unir a al menos una porción de las células cancerosas que expresan el polipéptido de FcRH5 en el mamífero. En una forma de realización preferida, el anticuerpo es efectivo para destruir o matar células tumorales que expresan FcRH5 o inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, después de la unión del polipéptido de FcRH5 en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti–FcRH5 desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o inhibidoras del crecimiento celular se pueden utilizar adicionalmente con un agente citotóxico para volverlos aún más potentes en la destrucción de la célula tumoral. Las propiedades citotóxicas pueden ser conferidas a un anticuerpo anti–FcRH5, por ejemplo, por la conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado como se describe en la presente. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento con preferencia es una pequeña molécula. Se prefiere toxinas tales como calicheamicina o un maytansinoide y sus análogos o derivados.

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención, y un portador. Para los fines de tratar el cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente que necesita tal tratamiento, en donde la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti–FcRH5 presentes como inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En una forma de realización adicional, las

composiciones pueden comprender estos anticuerpos en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, que incluyen los agentes quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención, y un portador. En una forma de realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti–FcRH5. Están abarcados los ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L, y en especial las cadenas de los residuos de la región hipervariable que codifican el anticuerpo de secuencia nativa así como las variantes, modificaciones y versiones humanizadas.

La invención también proporciona métodos útiles para tratar el cáncer que expresa un polipéptido de FcRH5 o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti–FcRH5 al mamífero. Las composiciones terapéuticas del anticuerpo se pueden administrar a corto plazo (agudo) o crónico o en forma intermitente según sea indicado por el médico. También se proporcionan métodos de inhibir el crecimiento, y destruir una célula que expresa un polipéptido de FcRH5.

La invención también proporciona kits y artículos de manufactura que comprenden al menos un anticuerpo anti–FcRH5. Los kits que contienen anticuerpos anti–FcRH5 se usan, por ejemplo, para los ensayos de destrucción de células FcRH5, para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido de FcRH5 de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación del FcRH5, el kit puede contener un anticuerpo anti–FcRH5 acoplado a las microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Se pueden proveer kits que contienen los anticuerpos para la detección y la cuantificación de FcRH5 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil

para la detección se puede proveer con una marca tal como marca fluorescente o radiactiva.

I. Tratamientos con conjugado anticuerpo–fármaco

Está contemplado que los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de la presente invención se pueden usar para tratar varias enfermedades o trastornos, por ejemplo caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Los ejemplos de enfermedades y trastornos proliferativos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos; leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromales, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, que incluyen los autoinmunes.

Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos basados en células se pueden analizar posteriormente en primates superiores que portan tumores y ensayos clínicos humanos. Los ensayos clínicos humanos se pueden diseñar para analizar la eficacia del anticuerpo anti–FcRH5 monoclonal o inmunoconjugado de la invención en pacientes que experimentan un trastorno proliferativo de las células B que incluye sin limitación linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto. El ensayo clínico se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinaciones con regímenes terapéuticos conocidos, tales como radiación y/o quimioterapia que involucran agentes quimioterapéuticos y/o citotóxicos conocidos.

Generalmente, la enfermedad o trastorno tratados es una enfermedad hiperproliferativa tal como un trastorno proliferativo de las células B y/o un cáncer de células B. Los ejemplos del cáncer que se trata en la presente incluyen, pero sin limitación, trastorno proliferativo de las

células B seleccionado de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

El cáncer puede comprender células que expresan FcRH5, de modo que el ADC de la presente invención puede unirse a las células cancerosas. Para determinar la expresión de FcRH5 en le cáncer, se dispone de varios ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una forma de realización, la sobreexpresión de FcRH5 se puede analizar por IHC. Las secciones de tejido incluidas en parafina de una biopsia tumoral se pueden someter al ensayo de IHC y acordar un criterio de intensidad de tinción de la proteína de FcRH5 y en qué proporción de células se examina.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad tratada, como se definió anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si la molécula se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, antecedentes clínicos del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico asistente. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Con preferencia, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyecciones subcutáneas. De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (*por ej.,* 0,1–20 mg/kg) de la molécula es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, sea, por ejemplo por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. UN ejemplo de dosis de ADC administrada a un paciente está en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del paciente.

Para las administraciones repetidas durante varios días o más, de acuerdo con la afección, el tratamiento se sostiene hasta una que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de régimen de dosis comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti–ErbB2. Otros regímenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

J. Terapia de combinación

Un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) de la invención se puede combinar en una formulación farmacéutica combinada, o régimen de dosificación en forma de terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anti–cáncer. El segundo compuesto de la formulación farmacéutica combinada o régimen de dosificación con preferencia tiene actividades complementarias con el ADCde la combinación de modo que estas no se afectan adversamente entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en la combinación en cantidades que son efectivas para el fin deseado. Una composición farmacéutica que contiene un ADC de la invención también pueden tener una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa o un ligando de ADN.

En un aspecto, el primer compuesto es un ADC de anti–FcRH5 de la invención y el segundo compuesto es un anticuerpo anti–CD20 (sea un anticuerpo desnudo o un ADC). En una forma de realización el segundo compuesto es un anticuerpo anti–CD20 rituximab (Rituxan®) o 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Otros anticuerpos útiles para la inmunoterapia combinada con los ADC de anti–FcRH5 de la invención incluyen sin limitación, anti–FcRH5 (por ejemplo, Avastin®).

Otros regimenes terapéuticos se pueden combinar con la administración de un agente anticáncer identificado de acuerdo con esta invención, que incluye sin limitación terapia de radiación y/o trasplantes de médula ósea y sangre periférica, y/o un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. En una de esta formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, adriamicina, doxorrubincina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP, o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti–CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti–FcRH5 (por ejemplo, Avastin®).

La terapia de combinación se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde con preferencia hay un período de tiempo mientras ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

En una forma de realización, el tratamiento con un ADC involucra la administración combinada de un agente anticáncer identificado en la presente, y uno o más agente quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluye la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y los esquemas de dosis para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o determinado en forma empírica por el profesional experto. La preparación y los esquemas de dosis para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son los que se usan en la presente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente recientemente identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y ser "sinérgica", es decir, el efecto obtenido cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos en forma separada. Un efecto sinérgico se puede obtener cuando los ingredientes activos: (1) se coformulan y administran o aplican en forma simultánea en una formulación de unidad de dosis combinada; (2) se administra en forma alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia alternada, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o aplican en forma secuencial, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra una dosis efectiva de cada ingrediente en forma secuencial, es decir, en forma seriada, mientras que en la terapia de combinación, las dosis efectivas de dos o más ingredientes se administran juntas.

La terapia de combinación de la invención además puede comprender uno o más agente quimioterapéuticos. La administración combinada incluye coadministración o administración concurrente, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde con preferencia hay un período de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

El agente quimioterapéutico, si se administra, usualmente se administra a las dosis conocidas para este, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico

antimetabolito. La preparación y los esquemas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o c determinado empíricamente por el profesional experto.

Varios agentes quimioterapéuticos que se pueden combinar se describen en la presente.

En algunas formas de realización, los agentes quimioterapéuticos que se combinan se seleccionan del grupo que consiste en inmunomoduladores (IMid) (que incluye talidomida y Revlimid® (lenalidomida)), inhibidores de proteasoma (tales como Velcade® (bortezomib) y PS342), taxoide bora (que incluye docetaxel y paclitaxel), vinca (tales como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tales como carboplatino o cisplatino), inhibidor de aromatasa (tales como letrozol, anastrazol, o exemestano), anti–estrógeno (por ejemplo fulvestrant o tamoxifeno), etoposide, tiotepa, ciclofosfamida, pemetrexed, metotrexato, doxorrubicina liposómica, doxorrubicina liposómica pegilada, capecitabina, gemcitabina, meltalina, doxorrubicina, vincristina, inhibidor de COX–2 (por ejemplo, celecoxib), o esteroide (por ejemplo, dexametasona y prednisona). En algunas formas de realización (por ejemplo, las formas de realización que involucran el tratamiento del mieloma múltiple), se combinan dexametasona y lenalidomida, o dexametasona, o bortezomib, o vincristina, doxorrubicina y dexamethason, o talidomida y dexametasona, o doxorrubicina liposómica, vincristina y dexametasona, o lenalidomida y dexametasona, o bortezomib y dexametasona, o bortezomib, doxorrubicina, y dexametasona.

En algunas formas de realización, los agentes quimioterapéuticos combinados se seleccionan del grupo que consiste en Revlimid® (lenalidomida), inhibidores de proteasoma (tales como Velcade® (bortezomib) y PS342), taxoide bora (que incluye docetaxel y paclitaxel), vinca (tales como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tales como carboplatino o cisplatino), inhibidor de aromatasa (tales como

letrozol, anastrazol, o exemestano), anti–estrógeno (por ejemplo fulvestrant o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, pemetrexed, metotrexato, doxorrubicina liposómica, doxorrubicina liposómica pegilada, capecitabina, gemcitabina, melthalin, doxorrubicina, vincristina, inhibidor de COX–2 (por ejemplo, celecoxib), o esteroide (por ejemplo, dexametasona y prednisona).

En algunas formas de realización (por ejemplo, las formas de realización que involucran el tratamiento del mieloma maligno), se combinan dexametasona y lenalidomida, o dexametasona, y bortezomib.

En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende un anticuerpo o inmunoconjugado y más de un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo o inmunoconjugado se puede combinar con (i) vincristina, doxorrubicina (en una formulación liposómica o no liposómica), y dexametasona; (ii) talidomida y dexametasona; (iii) Velcade® (bortezomib), doxorrubicina, y dexametasona; (iv) Velcade® (bortezomib), talidomida, y dexametasona; (v) melfalan y prednisona; (vi) melfalan, prednisona, y talidomida; (vii) melfalan, prednisona, y Velcade® (bortezomib); (viii) vincristina, doxorrubicina, y dexametasona; o (ix) talidomida y dexametasona.

En una forma de realización, la terapia de combinación puede comprender un anticuerpo o inmunoconjugado descriptos en la presente y uno o más de (i) Velcade® (bortezomib), (ii) dexametasona, (iii) Revlimid® (lenalidomida). En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende un anticuerpo o inmunoconjugado y dexametasona y Revlimid® (lenalidomida) o Velcade® (bortezomib) y dexametasona. En otra forma de realización, la terapia de combinación comprende un anticuerpo o inmunoconjugado y uno de Velcade® (bortezomib), dexametasona y Revlimid® (lenalidomida).

K. Artículos de manufactura y kits

Otra forma de realización de la invención es un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnosis del cáncer que expresa FcRH5. El artículo de manufactura comprende un recipiente y un rótulo o prospecto inserto o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo frascos, viales, jeringas. Los recipientes pueden estar construidos de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección de cáncer y puede tener una puerta de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene una un tapón perforable por una aguja inyectable hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti–FcRH5 de la invención. El rótulo o prospecto indica que la composición se usa para tratar el cáncer. El rótulo o prospecto además comprenderá instrucciones para administrar la composición de anticuerpo al paciente de cáncer. Alternativamente o adicionalmente, el artículo de manufactura también puede comprender un segundo recipiente que comprende un buffer aceptable para uso farmacéutico, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina buffer con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros buffer, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para varios fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células que expresan FcRH5, para purificación o inmunoprecipitación del polipéptido de FcRH5 de las células. Para el aislamiento y purificación del polipéptido de FcRH5, el kit puede contener un anticuerpo anti–FcRH5 acoplado a microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Se pueden proveer kits que contienen los anticuerpos para la detección y la cuantificación del polipéptido de FcRH5 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Como en el artículo de manufactura, el kit comprende un recipiente y un

recipiente y un rótulo o prospecto inserto o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-FcRH5 de la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y buffers, anticuerpos de control. El rótulo o prospecto puede proveer una descripción de la composición así como las instrucciones para el uso in vitro o de detección deseado.

L. Usos de los polipéptidos de FcRH5

Esta invención abarca método de detección de compuestos para identificar los que imitan al polipéptido de FcRH5 (agonistas) o impiden el efecto del polipéptido de FcRH5 (antagonistas). Los ensayos de detección para los candidatos del fármaco antagonista se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos de FcRH5 codificados por los genes identificados en la presente, o interfieren de otro modo en la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, que incluyen por ejemplo, inhibición de la expresión del polipéptido de FcRH5 de las células. Dichos ensayos de detección incluirán ensayos susceptibles a la detección de alto rendimiento de bibliotecas químicas, lo que los convierte en particularmente adecuados para identificar candidatos farmacológicos de molécula pequeña.

Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de detección bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que ellos requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido de FcRH5 codificado por un ácido nucleico identificado en la presente en las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede asilar o detectar en la mezcla de reacción. En una

forma de realización particular, el polipéptido de FcRH5 codificado por el gen identificado en la presente o el fármaco candidato se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, por uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se obtiene generalmente por el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido de FcRH5 y desecante. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido de FcRH5 inmovilizado se puede usar para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza por el agregado de componente no inmovilizado, que puede estar marcado con una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa se extraen los componentes sin reaccionar, por ejemplo, por lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta una marca detectable, la detección de marca inmovilizada en la superficie indica que se ha producido la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta una marca, no se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, por el uso de un anticuerpo marcado que se une especificamente al complejo marcado.

Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido particular de FcRH5 codificado por un identificado en la presente, su interacción con este polipéptido se puede analizar por métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen los métodos tradicionales, tales como, por ejemplo, entrecruzamiento, co–inmunoprecipitación, y co–purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorear por medio del sistema genéticos de basado en levaduras descripto por Fields y colaboradores (Fields and Song, Nature (London), 340:245–246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578–9582 (1991)) como se

describe en Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789–5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente diferenciados, uno actúa como el dominio de unión al ADN, el otro que funciona como el dominio transcripción–activación. El sistema de expresión de levadura descripto en las publicaciones precedentes (generalmente denominado como el "sistema de dos híbridos) aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas hibridas, una en que la proteína blanco ese fusiona el dominio de unión del ADN de GAL4, y otra, en que las proteínas de activación candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1–*lac*Z bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 por medio de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para β–galactosidasa. Un kit completo (MATCHINGMAKER™) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas que usa la técnica de dos híbridos está disponible en el comercio en Clontech. Este sistema también se puede extender para mapear los dominios de proteína involucrados en las interacciones de proteínas específicas así como los residuos de aminoácidos localizados exactamente que son críticos para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren en la interacción de un gen que codifica un polipéptido de FcRH5 identificado en la presente y otros componentes intra– o extracelulares se pueden analizar de la siguiente manera: usualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra– o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permita la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. La unión

(formación del complejo) entre el compuesto de ensayo y los componentes intra– o extracelulares presentes en la mezcla se controla como se describió antes en la presente. La formación de un complejo en la reacción de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere en la interacción del compuesto de ensayo y su compañero de reacción.

Para analizar los antagonistas, el polipéptido de FcRH5 se puede añadir a una célula junto con el compuesto analizada para una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido de FcRH5 indica que el compuesto es un antagonista al polipéptido de FcRH5. Alternativamente, los antagonistas se pueden detectar por combinación del polipéptido de FcRH5 y un antagonista potencial con receptores del polipéptido de FcRH5 unido a membrana o receptores recombinantes en condiciones apropiadas para ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido de FcRH5 puede estar marcado, tal como por radiactividad, de modo que se pueden usar numerosas moléculas de polipéptido de FcRH5 unidas al receptor para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor se puede identificar por numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, inmunopurificación de ligando y separación FACS. Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Con preferencia, se emplea la clonación de expresión en donde se prepara ARN poliadenilado a partir una célula receptiva al polipéptido de FcRH5 y se crea una biblioteca de ADNc de esta ARN se divide en mezclas y se usa para transfectar células COS u otras células que no son receptivas al polipéptido de FcRH5. Las células transfectadas cultivadas en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido de FcRH5 marcado. El polipéptido de FcRH5 se puede marcar por una variedad de medios que incluye yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a los análisis autorradiográficos.

Las mezclas positivas se identifican y se preparar submezclas y se re–transfectan usando un proceso de sub-mezcla y re-detección interactivos, finalmente producen un clon único que codifica el receptor putativo.

Como un método alternativo para la identificación del receptor, el polipéptido de FcRH5 marcado se puede ligar por fotoafinidad con la membrana celular o extraer preparaciones que expresan la molécula del receptor. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor se puede escindir, resolver en los fragmentos de péptidos y someter a microsecuenciación. La secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación se podría usar para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótido degeneradas para detectar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamífero o una preparación de membrana que expresa el receptor se podrían incubar con el polipéptido de FcRH5 marcado en presencia del compuesto candidato. Por lo tanto se podría medir la capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Los ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de la inmunoglobulina con el polipéptido de FcRH5, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli– y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de estos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido de FcRH5 que reconoce el receptor pero no imparte efecto, de este modo inhibe competitivamente la acción del polipéptido de FcRH5.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de FcRH5 identificado en la presente, así como otras moléculas identificadas

por los ensayos de detección descriptos anteriormente en la presente, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, que incluyen cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido de FcRH5 es intracelular y los anticuerpos totales se usan como inhibidores, se prefieren los anticuerpos de internalización. Sin embargo, también se pueden usar lipofecciones o liposomas para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína blanco. Por ejemplo, sobre la base de las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de proteína blanco. Dichos péptidos se pueden sintetiza químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante. Ver, *por ejemplo,* Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889–7893 (1993).

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular tratada, con preferencia aquellos con actividades complementarias que no afectan adversamente entre sí. En forma alternativa o adicional, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tales como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor de crecimiento. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivos para el fin deseado

M. Derivados del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden modificar para contener residuos no proteináceos adicionales que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Con preferencia, los residuos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen pero 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 (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (*por ejemplo*, glicerol), alcohol polivinílico y sus mezclas. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas para la fabricación debida a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si más de un polímero se une, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o el tipo de los polímeros usados para la derivatización sobre la base de las consideraciones que incluyen pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo mejorado, si el derivado del anticuerpo se usará en una terapia en condiciones patológicas definidas, etc.

N. Método de prueba

Aún otra forma de realización de la presente invención se refiere a un método de determinar la presencia de un polipéptido de FcRH5 en una muestra que se sospecha que contiene el polipéptido de FcRH5, en donde el método comprende exponer la muestra a un conjugado de anticuerpo y fármaco de este, que se une al polipéptido de FcRH5 y determinar la unión del conjugado de anticuerpo y fármaco de este, al polipéptido de FcRH5 de la muestra, en donde la presencia de dicha unión es indicativa de la presencia del polipéptido de FcRH5 en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) que se sospecha que expresan el polipéptido de FcRH5. El conjugado de anticuerpo y fármaco de este, empleado en el método opcionalmente se puede marcar en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un método de diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero, en donde el método comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende células de tejido obtenidas del mamífero con un conjugado de anticuerpo y fármaco de este, que se une a un polipéptido de FcRH5 y (b) detectar la formación de un complejo entre el conjugado de anticuerpo y fármaco, y el polipéptido de FcRH5 en la muestra de ensayo, en donde la formación de un complejo es indicativo de la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el conjugado de anticuerpo y fármaco, se marca en forma detectable, unir a un soporte sólido, o similares, y/o la muestra de ensayo de las células del tejido de un individuo que se sospecha que tiene un tumor canceroso.

IV. Métodos adicionales de uso de anticuerpos anti–FcRH5 e inmunoconjugados

A. Métodos de diagnóstico y métodos de detección

En un aspecto, los anticuerpos anti–FcRH5 y los inmunoconjugados de la invención son útiles para detectar la presencia de FcRH5 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en la presente abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En ciertas formas de realización, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan FcRH5 en niveles superiores respecto de otros tejidos, por ejemplo, las células B y/o tejidos asociados con las células B.

En un aspecto, la invención proporciona un método de detectar la presencia de FcRH5 en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–FcRH5 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti–FcRH5 a FcRH5, y detectar si un complejo se forma entre el anticuerpo anti–FcRH5 y FcRH5.

En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnosticar un trastorno asociado con aumento de expresión de FcRH5. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti–FcRH5; determinar el nivel de expresión (sea en forma cuantitativa o cualitativa) de FcRH5 por la célula de ensayo por la detección de la unión del anticuerpo anti–FcRH5 a FcRH5; y comparar el nivel de expresión de FcRH5 por la célula de ensayo con el nivel de expresión de FcRH5 por una célula control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de ensayo o una célula que expresa FcRH5 a niveles comparables con dicha célula normal), en donde un mayor nivel de expresión de FcRH5 por la célula de ensayo en comparación con la célula control indica la presencia de un trastorno asociado con aumento de expresión de FcRH5. En ciertas formas de realización, la célula de ensayo se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con aumento de expresión de FcRH5. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor.

El ejemplo de trastorno proliferativo celular que se puede diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluye un trastorno de las células B y/o un trastorno proliferativo de las células B que incluye, pero sin limitación, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En ciertas formas de realización, un método de diagnóstico o detección, tales como los descriptos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti–FcRH5 al FcRH5 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa FcRH5 en su superficie. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti–

FcRH5 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti–FcRH5 al FcRH5, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti–FcRH5 y FcRH5 en la superficie celular. Un ejemplo de ensayo para detectar la unión de un anticuerpo anti–FcRH5 al FcRH5 expresado en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Ciertos otros métodos se pueden usar para detectar la unión de anticuerpos anti–FcRH5 a FcRH5. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión bien conocidos en la técnica, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC)).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti–FcRH5 están marcados. Las marcas incluyen, pero sin limitación, marcas o residuos que se detectan directamente (tales como marcas fluorescentes, cromofóricos, electrodensa, quimioluminiscente y radicativa), así como residuos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de marcas incluyen pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rhodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, *por ejemplo*, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, *por ejemplo*, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcas de espín, marcas de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti–FcRH5 se inmovilizan en una matriz insoluble. La inmovilización puede suponer la separación de un anticuerpo anti-FcRH5 de cualquier FcRH5 que queda libre en solución. Estos se obtiene en forma convencional por la insolubilización del anticuerpo anti-FcRH5 antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al.*, U.S. 3.720.760), o por acoplamiento covalente (por ejemplo, usando entrecruzamiento con glutaraldehido), o por la insolubilización del anticuerpo anti-FcRH5 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti–FcRH5 y FcRH5, *por ejemplo*, po inmunoprecipitación.

Cualquiera de las formas de realización anteriores de diagnóstico o detección se puede realizar usando un inmunoconjugado de la invención en lugar o además de un anticuerpo anti–FcRH5.

B. Métodos terapéuticos

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos in vitro, ex vivo, e in vivo. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir crecimiento o proliferación celular, sea in vivo o in vitro, el método que comprende exponer una célula a un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a FcRH5. "Inhibición del crecimiento o proliferación celular" significa reducir el crecimiento o proliferación celular en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 100%, e incluye inducir la muerte celular. En ciertas formas de realización, la célula es una célula tumoral. En ciertas formas de realización, la célula es una célula B. En ciertas formas de realización, la célula es un xenoinjerto, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente.

En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se usa para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de las células B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo celular se asocia

con aumento de expresión y/o actividad de FcRH5. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de las células B se asocia con el aumento de expresión de FcRH5 en la superficie de las células B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de las células B es un tumor o un cáncer. Los ejemplos del trastorno proliferativo de las células B tratadas por los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar un trastorno proliferativo de las células B que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de este. En ciertas formas de realización, un método para tratar un trastorno proliferativo de las células B comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de anti–FcRH5 y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, tal como los que se proporciona a continuación. En ciertas formas de realización, un método para tratar un trastorno proliferativo celular comprende administrar a un individuo una cantidad efectiva de una formulación farmacéutica que comprende 1) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 y un agente citotóxico; y opcionalmente, 2) al menos una agente terapéutico adicional, tal como los que se proporcionan a continuación.

En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden unir FcRH5 de especies diferentes de la humana. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar para unir FcRH5, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene FcRH5, en los seres humanos,

o en otros mamíferos que tienen un FcRH5 con el que un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención reacciona en forma cruzada (por ejemplo chimpancé, chimpancé, babuino, mono tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una forma de realización, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado se puede usar para dirigirse al FcRH5 en las células B por el contacto del anticuerpo o inmunoconjugado con FcRH5 para formar un anticuerpo o complejo de inmunoconjugado–antígeno de modo que una citotoxina conjugadas del inmunoconjugado acceda al interior de la célula. En una forma de realización, el FcRH5 es FcRH5 humano.

En una forma de realización, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado se puede usar en un método para la unión de FcRH5 en un individuo que sufre de un trastorno asociado con aumento de la expresión y/o actividad de FcRH5, el método que comprende administrar al individuo el anticuerpo o inmunoconjugado de modo que FcRH5 se une en el individuo. En una forma de realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se incorpora en la célula B que expresa FcRH5. En una forma de realización, el FcRH5 es FcRH5 humano, y el individual es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede un mamífero que expresa FcRH5 al que se une un anticuerpo anti–FcRH5. Aún otro individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido FcRH5 (por ejemplo, por la administración de FcRH5 o por la expresión de un transgén que codifica FcRH5).

Un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado se puede administrar a un ser humano para fines terapéuticos. Más aún, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado se puede administrar a un mamífero que expresa FcRH5 con el que el anticuerpo reacciona en forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Respecto de este último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo, análisis de dosis y tiempos de administración).

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, adriamicina, doxorrubincina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP, o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti–CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti–FcRH5 (por ejemplo, Avastin®), en donde la terapia de combinación es útil en el tratamiento de cánceres y/o trastorno de las células B tales como trastorno proliferativo de las células B que incluye linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

Dichas terapias de combinación indicadas antes abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en formulaciones iguales o separadas), y la administración separada, en tal caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede producirse antes, en forma simultánea y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención también se pueden usar en combinación con la terapia de radiación.

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional o adyuvante) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutánea,

intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente por infusión por pulso, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo o inmunoconjugado. La dosis puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo que depende en parte si la administración es breve o crónica.

Los agentes terapéuticos usados en la invención (por ejemplo, anticuerpos o inmunoconjugados de la invención) se deben formular, dosificar y administrar de un modo compatible con la buena práctica médica. Los factores en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el mamífero particular tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos a los profesionales médicos. El anticuerpo o inmunoconjugado no necesita ser, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos agentes diferentes depende de la cantidad del anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descriptos anteriormente. Estos en general se usan en las mismas dosis y con vías de administración descriptas en la presente, o aproximadamente de 1 a 99%, de las dosis descripta en la presente, o en cualquier dosis y por cualquier vía determinada en forma empírica/clínica como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se usan solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá el tipo de enfermedad tratado, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la

gravedad y tiempo de la enfermedad, sea el anticuerpo o inmunoconjugado administrado para los fines preventivos o terapéuticos, previa terapia, la antecedente clínico del paciente y respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado, y el criterio del médico asistente. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. De acuerdo con el tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg–20 mg/kg) del anticuerpo o inmunoconjugado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, según la afección, el tratamiento se sostiene hasta se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo o inmunoconjugado puede estar en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En consecuencia, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas) del anticuerpo o inmunoconjugado se puede administrar al paciente. Dichas dosis se pueden administrar de modo intermitente por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Se puede administrar una dosis de carga inicial superior, seguida por uno o más dosis menores. Un ejemplos de régimen de dosificación comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regimenes de dosis pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

C. Ensayos de actividad

Los anticuerpos anti–FcRH5 e inmunoconjugados de la invención se pueden caracterizar para sus propiedades físico/químicas y/o actividades biológicas por varios ensayos conocido en la técnica.

1. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporciona ensayos para identificar anticuerpos anti–FcRH5 o los inmunoconjugados estos que tiene actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación celular (por ejemplo, actividad de "destrucción celular"), o la capacidad de inducir muerte celular, que incluye la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

En ciertas formas de realización, se analiza un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de este en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vitro. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o la proliferación celular son bien conocidos en la técnica. Ciertos ensayos de proliferación celular, ejemplificada por los ensayos de "destrucción celular" que se describen en la presente, miden viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter–Glo™, que está disponible en el comercio en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina la cantidad de células viables en el cultivo sobre la base de la cuantificación del ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Ver Crouch et al (1993) J. Inmunol. Meth. 160:81–88, Patente U.S. No. 6602677. El ensayo se puede realizar en un formato de 96 o 384 pocillos, lo que lo hace susceptible de la detección de alto rendimiento automatizada (HTS). Ver Cree et al (1995) Anticancer Drugs 6:398–404. El procedimiento de ensayo involucra añadir un solo reactivo (CellTiter–Glo® Reagent) directamente a las células cultivadas. Esto produce lisis celular de una señal luminiscente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es

directamente proporcional a la cantidad de células viables presentes en el cultivo. Los datos se pueden registrar por un luminómetro o dispositivo de imágenes por cámara CCD. El resultado de luminiscencia se expresa como unidades luminosas relativas (RLU).

Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo de "MTT", un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro de 3–(4,5–dimetiltiazol–2–il)–2,5–difeniltetrazolio a formazan por la reductasa mitocondrial. Como el ensayo CellTiter–Glo™, este ensayo indica la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Ver, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Inmunol. Meth. 65:55–63, y Zhang et al. (2005) Cáncer Res. 65:3877–3882.

En un aspecto, un anticuerpo anti–FcRH5 se analiza en cuando a su capacidad para inducir la muerte celular in vitro. Los ensayos para la inducción de muerte celular son bien conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, tales ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de integridad de la membrana pérdida de la integridad de la membrana, indicada por ejemplo, por captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (ver Moore et al. (1995) Citotechnology, 17:1–11), o 7AAD. En un ejemplo de ensayo de captación de PI, las células se cultivan en medio Eagle modificado de Dulbecco (D–MEM):Ham's F–12 (50:50) suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone) y 2 mM de L–glutamina. En consecuencia, el ensayo se realizar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes. Las células se siembran a una densidad de 3 x 10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se dejan fijar toda la noche. El medio se extrae y se reemplaza con medio fresco solo o medio que contiene varias concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Después del tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinización. Las células luego se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el pellet se resuspende en 3 ml de buffer de unión de Ca^{2+} frío (10 mM de Hepes, pH 7,4, 140 mM de NaCl, 2,5 mM

de $CaCl_2$) y se alicuotan en tubos 12 x 75 tapados con filtro de 35 mm (3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los agregados celulares. Los tubos luego reciben el PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinado por la captación de PI se identifican de este modo.

En un aspecto, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado en cuando a su capacidad para inducir apoptosis (muerte celular programada) in vitro. Un ejemplo de ensayo para anticuerpos o inmunoconjugados que induce apoptosis es un ensayo de unión de anexina. En un ejemplo de ensayo de unión de anexina, las células se cultivan y siembran en las placas como se describió en el párrafo precedente. El medio se extrae y se reemplaza con medio fresco solo o medio que contiene 0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un período de 3 días de incubación, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinización. Las células luego se centrifugan a 1200 rpm, se resuspenden en 3 buffer de unión de Ca^{2+} y se alicuotan en tubos como se describió en el párrafo precedente. Los tubos luego reciben anexina marcada (por ejemplo anexina V–FITC) (1 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® CellQuest (BD Biosciences). Los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina respecto del control se identifican de este modo. Otro ejemplo de ensayo para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico ELISA de ADN para detectar la degradación internucleosómica del ADN genómico. Dicho ensayo se puede realizar usando, por ejemplo, el kit de detección de muerte celular por ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

Las células para uso en cualquiera de los anteriores ensayos in vitro incluye células o líneas celulares que expresan naturalmente FcRH5 o que han sido manipuladas genéticamente para expresar FcRH5. Dichas células incluyen células tumorales que sobreexpresan FcRH5 respecto de las células normales del mismo origen tisular. Dichas células también incluyen líneas celulares (que incluyen líneas tumorales celulares) que expresan FcRH5 y líneas celulares que no expresan normalmente FcRH5 pero se han transfectado con ácido nucleico que codifica FcRH5.

En un aspecto, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de este se analiza para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación celular in vivo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti–FcRH5 o inmunoconjugado de este se analiza para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Un sistema de modelo in vivo, tales como los modelos de xenoinjerto, se puede usar para dicho análisis. En un ejemplo de sistema de xenoinjerto, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido, por ejemplo, un ratón SCID. Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se administra al animal. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado para inhibir o reducir el crecimiento tumoral. En ciertas formas de realización del sistema de xenoinjerto anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Dichas células útiles para preparar modelos de xenoinjerto incluyen líneas celulares de leucemia y linfoma humano, que incluyen sin limitación las células BJAB–luc (una línea celular de linfoma de Burkitt negativa para EBV transfectada con el gen indicador de luciferasa), células Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL–1923), células SuDHL–4 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, AAC 495), células DoHH2 (ver Kluin–Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221–224 (1991), y Kluin–Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385–1391 (1994)), Granta–519 células (ver Jadíael, D.M. et al, Leukemia 11(1):64–72 (1997)). En ciertas formas de realización, las células tumorales humorales se introducen en

un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido por inyección subcutánea o por trasplante en un sitio adecuado, tal como un panículo adiposo mamario.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo anti–FcRH5 se analiza para determinar su actividad de unión al antígeno. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, un anticuerpo anti–FcRH5 se analiza para determinar su capacidad para unirse al FcRH5 expresado en la superficie de una célula. Se puede usar un ensayo FACS para dicho análisis.

En un aspecto, se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo murino 10A8 (mu10A8 y/o anticuerpo humanizado 10A8v1 (hu10A8v1) para la unión a FcRH5. En ciertas formas de realización, dicho anticuerpo competitivo se une al mismo epitope (por ejemplo, un epitope lineal o conformacional) que se une al anticuerpo murino 10A8 (mu10A8) y/o 10A8v1 humanizado (hu10A8 v1). Los ejemplos de ensayos de competición incluyen, pero sin limitación, ensayos de rutina tales como los provistos en Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch,14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Los ejemplos de métodos detallados para el mapeo de un epitope al que se unen un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en Methods in Molecular Biología vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epitope si cada uno bloquea la unión del otro en 50% o más.

En un ejemplo de ensayo de competición, FcRH5 inmovilizado se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo murino 10A8 (mu10A8), anticuerpo quimérico 10A8 (ch10A8) y/o anticuerpo humanizado 10A8 v1 (hu10A8 v1)) y un segundo anticuerpo no marcado que se analiza para determinar su actividad para competir con el primer anticuerpo para la unión a FcRH5. El segundo anticuerpo puede estar presente en un

sobrenadante del hibridoma. Como control, FcRH5 inmovilizado se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a FcRH5, se elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marca asociada con el FcRH5 inmovilizado. Si la cantidad de marca asociada con FcRH5 inmovilizado está sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con respecto a la muestra control, por lo tanto esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión al FcRH5. En ciertas formas de realización, el FcRH5 inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa FcRH5 en su superficie.

En un aspecto, los anticuerpos anti–FcRH5 purificados se pueden caracterizar adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N–terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión por exclusión de tamaño no desnaturalizante (HPLC), espectrometría de masa, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En una forma de realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en que la vida media del anticuerpo in vivo es importante, aún cuando ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas formas de realización, se miden las actividades del Fc del anticuerpo para asegurar que solo se mantienen las propiedades deseadas. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/depleción de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión del receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (en consecuencia probablemente carece de actividad de ADCC), pero retiene la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para

mediar ADCC, células NK, solo expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se sintetiza en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Inmunol. 9:457–92 (1991). Un ejemplo de un ensayo in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente U.S. No. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). En forma alternativa o adicional, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como se describe en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652–656 (1998). Los ensayos de unión de C1q también se pueden realizar para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir C1q y en consecuencia carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano–Santoro et al., J. Inmunol. Methods 202:163 (1996). La unión a FcRn y las determinaciones de depuración/vida media in vivo también se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Todas las patentes y referencias bibliográficas citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Se usaron los reactivos disponibles en el comercio con referencia a los ejemplos de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique de otro modo. Los anticuerpos usados en los ejemplos son anticuerpos disponibles en el comercio e o anticuerpos descriptos en la presente. La fuente de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por los números de acceso

ATCC es American Type Culture Collection, Manassas, VA. EJEMPLO 1: Preparación de anticuerpos que se unen a FcRH5

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unir específicamente a FcRH5.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Goding, supra. Los inmunógenos que se pueden emplear incluyen FcRH5 purificado, proteínas de fusión que contienen FcRH5, y células que expresan FcRH5 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede ser realizada por los profesionales expertos sin experimentación indebida.

Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de FcRH5 emulsionado en adyuvante de Freund completo y se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. En forma alternativa, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Inmunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de la pata trasera del animal. A los ratones inmunizados luego se les administra un refuerzo 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. De aquí en adelante, durante varias semanas, a los ratones también se les puede aplicar un refuerzo con inyecciones de inmunización adicional. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente a partir del sangrado retroorbital para análisis en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-FcRH5.

Después de que se ha detectado un título adecuado de anticuerpos, los animales "positivos" para los anticuerpos se pueden inyectar con una inyección intravenosa final de inmunógeno. Tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recolectan las células del bazo. Las células del bazo luego se fusionan (usando 35% de polietilenglicol) a una línea celular de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponible en ATCC, N.º CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden sembrar en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que

contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células.

Las células de hibridoma se analizarán en un ELISA para determinar la reactividad contra el inmunógeno. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra el inmunógeno está dentro de la experiencia en la materia.

Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones singeneicos Balb/c para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-inmunógeno. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar en matraces de cultivo de tejido o frascos giratorios. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis se puede lograr usando precipitación con sulfato de amonio, seguida por cromatografía de exclusión por gel. En forma alternativa, se puede emplear cromatografía de afinidad sobre la base de la unión del anticuerpo a la proteína A o proteína G.

Los anticuerpos dirigidos con ciertos polipéptidos de FcRH5 que se describen en la presente se pueden producir con éxito mediante esta técnica. En forma más específica, los anticuerpos monoclonales funcionales que son capaces de reconocer y unirse a la proteína de FcRH5, que incluye las formas humanas y de cynomologus de las proteínas de FcRH5, (medida por ELISA estándar, análisis de selección FACS y/o análisis inmunohistoquímico) se pueden generar con éxito contra las siguientes proteínas de FcRH5, que incluyen las formas humanas y de cynomologus de las proteínas de FcRH5, que se describen en la presente: PRO820 (ADN56041), PRO52387 (ADN257845).

Además de la preparación de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos de FcRH5, que se describen en la presente, mucho de los anticuerpos monoclonales se pueden conjugar con éxito a una toxina celular para usar en la dirección de la toxina celular

a una célula (o tejido) que expresa un polipéptido de FcRH5 de interés (*in vitro* e *in vivo*). Por ejemplo, la toxina (por ejemplo, DM1) derivada de los anticuerpos monoclonales se puede generar con éxito en los siguientes polipéptidos de FcRH5, qe se describen en la presente: PRO820 (ADN56041), PRO52387 (ADN257845).

A. Generación de líneas estables de FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Para obtener líneas celulares para la detección de los anticuerpos FcRH5, se generaron líneas celulares de fibroblastos de ratón SVT2 que expresan en forma estable FcRH5/IRTA2 marcado y no marcado. El ADNc de FcRH5/IRTA2 se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de células del bazo y se clonó TA (Invitrogen) en pCR4. Para obtener el constructo de expresión no marcado, se clonaron los marcos de lectura abiertos (ORF) en el vector de expresión de mamífero pCMV.PD.nbe por medio de PCR para la adición de los sitios de restricción, la digestión del producto de PCR y el ligamiento en el vector. Los constructos de expresión marcados N–terminal se obtuvieron por la amplificación de los ORF de FcRH5/IRTA2 sin la secuencia señal y el ligamiento del producto de PCR en el vector pMSCVneo (Clontech) que contiene la marca gD y la secuencia señal (M G G T A A R L G A V I L F V V I V G H G V R G K Y A L A D A S L K M A D P N R F R G K D L P V L D Q L L) (SEQ ID NO: 1). Para cada FcRH5/IRTA2, se establecieron líneas celulares estables para usar en la detección de los anticuerpos monoclonales para la reactividad específica por FACS y la reactividad cruzada entre las FcRH/IRTAs. Los vectores marcados con gD y no marcados se transfectaron en SVT2 (cultivados en células en DMEM rico en glucosa + 10% de FBS + 2 mM de L–glutamina) por el protocolo estándar de Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, Ca). Los transfectantes marcados con gD se colocaron en 0,5 mg/ml de selección de geneticina (Invitrogen; Carlsbad, Ca) durante una semana y luego se separaron por FACS solo las células

con anticuerpo monoclonal específica con marca gD (gD:952, Genentech; South San Francisco) para obtener el clon de mayor expresión. Los transfectantes no marcados se colocaron vbajo selección con 5,0 ug/ml de puromicina (Calbiochem; La Jolla, Ca) hasta que crecieron colonias visibles. El ARN de cada colonia se aisló por el protocolo estándar Trizolâ (Invitrogen; Carlsbad, Ca) y se corrió TaqManâ (ABI; Foster City, Ca) para determinar el clon de mayor producción.

B. Generación de anticuerpos monoclonales para FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Se prepararon anticuerpos monoclonales murinos capaces de unirse a FcRH5 humano.

La proteína para la inmunización de los ratones se generó por transfección transitoria de los vectores que expresan el dominio extracelular marcado con His (ECD) de FcRH5/IRTA2 en las células CHO. La proteína se purificó a partir de los sobrenadantes de las células transfectadas en columnas de níquel y se confirmó la identidad de la proteína por secuenciación N-terminal.

Se hiperinmunizaron diez ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) con proteína recombinante marcada con polihistidina (HIS6) en adyuvante Ribi (Ribi Inmunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Las células B de ratones que demuestran altos títulos anticuerpo contra el inmunógeno por ELISA directo, y unión específica a las células de fibroblasto de ratón SVT2 que expresan el FcRH de interés por FACS, se fusionaron con las células de mieloma de ratón (X63.Ag8,653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) usando un protocolo modificado análogo al previamente descripto (Kohler y Milstein, 1975; Hongo et al., 1995). Después de 10 a 12 días, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para la producción y unión de anticuerpos por ELISA directo y FACS. Los clones positivos, que muestran la mayor unión inmune después de la segunda ronda de

subclonación por dilución limitante, se expandieron y cultivaron para la caracterización adicional, que incluye especificidad y reactividad cruzada de FcRH1, –2, –3, –4, y –5. Los sobrenadantes recogidos de cada linaje de hibridoma se purificaron por cromatografía de afinidad (cromatografía líquida de proteína rápida Farmacia (FPLC); Pharmacia, Uppsala, Suecia) usando un protocolo modificado análogo al que se describió previamente (Hongo et al., 1995). Las preparaciones de anticuerpo purificado luego se filtraron en forma estéril (0,2-µm de tamaño de poro; Nalgene, Rochester NY) y se conservaron a 4 °C en solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

Los anticuerpos monoclonales que son capaces de reconocer y unir la proteína de FcRH5 (medido por ELISA estándar, análisis de separación FACS y/o análisis inmunohistoquímico) se han generado con éxito contra PRO52837 (FcRH5c/IRTA2c) y se han denominado como:

anti–FcRH5–9E2 (en la presente denominado como 9E2 o 9E2,1,1) (ATCC No. PTA–7207, depositado el 9 de noviembre de 2005),

anti–FcRH5–1H4 (en la presente denominado como 1H4 o 1H4,1,1) (ATCC No. PTA–7208, depositado el 9 de noviembre de 2005),

anti–FcRH5–13G9 (en la presente denominado como 13G9 o 13G9,1,1) (que se describe en las solicitudes de patentes provisionales U.S. Nos. 61/211.695 presentada el 1 de abril de 2009 y 61/166.214 presentada el 2 de abril de 2009),

anti–FcRH5–4D10 (en la presente denominado como 4D10 o 4D10,1,1) (ATCC No. PTA–7210, depositado el 9 de noviembre de 2005),

anti–FcRH5–6H1 (en la presente denominado como 6H1 o 6H1,1,1) (ATCC No. PTA–7211, depositado el 9 de noviembre de 2005),

anti–FcRH5–8H6 (en la presente denominado como 8H6 o 8H6,1,1) (ATCC No. PTA–7212, depositado el 9 de noviembre de 2005),

anti–FcRH5–7D11 (en la presente denominado como 7D11 o 7D11,1,1) (descripta en la presente),

anti–FcRH5–10A8 (en la presente denominado como 10A8 o 10A8,1,1) (descripta en la presente).

1. Determinación de afinidad (análisis Biacore)

Se calcularon las afinidades de unión a FcRH de las IgG a partir de las constantes de asociación y disociación usando sistema resonancia de plasmón superficial con un Biacore 2000. Unchip biosensor se activó por acoplamiento covalente de IgG anti–murina (BR–1008–338) usando clorhidrato de N–etil–N'–(3–dimetilaminopropil)–carbodiimida (EDC) y N–hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BIAcore, Inc.). En breves palabras, en cada ciclo de análisis cinético, se capturaron 5 ul de 100 nM de IgG en el chip, se inyectaron diluciones seriadas dos veces con un caudal de flujo de 20 ul/min durante 150 sec. La disociación del antígeno se controló durante 180 segundos antes de la regeneración. Se calcularon las constantes de disociación en equilibrio a 25°C por el ajuste de los datos con un modelo de unión de Langmuir de 1:1. El buffer de corrida fue PBS con 0,05% de Tween –20. Los resultados se muestran en la la Tabla 9. Todos los anticuerpos se unieron al antígeno con una afinidad suficiente para ser utilizados como agentes terapéuticos.

Tabla 9

Anticuerpo humano	Afinidad (Biacore) al antígeno Hu	X–reactividad cyno (FACS) en células transfectadas en forma estable
1H4	6 nM	X*
4D10	3 nM	
6H1	< 0,1 nM	X
7D11	6 nM	X*

8H6	20 nM	X (by IHC)
9E2	0,2 nM	
10A8	N/A	X
10F5	N/A	X
13G9	19 nM	X

*muy leve en la concentración de saturación

C. Construcción y secuenciación de anticuerpos anti–FcRH5 humanos quiméricos

1. ***Anticuerpo FcRH5 anti-humano quimérico 7D11 (ch7D11)***

Para la construcción de IgG1 de 7D11 quimérico, se extrajo ARN total de las células de hibridoma 7D11 (obtenidas de Roswell Park Cancer Institute (Okazaki et al., *Blood,* 81(1): 84-95 (1993)) usando un Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat # 74104) y el protocolo sugerido por el fabricante. Usando las secuencias de aminoácidos N-terminal obtenidas de las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo monoclonal 7D11 se diseñaron los cebadores de PCR específicos para cada cadena. Se diseñaron cebadores inversos para RT-PCR para aparearse con la estructura 4 de la familia del gen que corresponde a la secuencia N-terminal. Los cebadores también se diseñaron para agregar los sitios de restricción para clonación. Para la cadena liviana, estos fueron Eco RV en el extremo N-terminal y KpnI en el extremo 3' de la estructura 4. Para la cadena pesada, los sitios agregados eran BsiWI en el extremo N terminal, y ApaI ligeramente corriente arriba de la unión de VH-CH1. Las secuencias del cebador son las siguientes:

7D11LCF.EcoRV (cebador delantero de la cadena liviana de 7D11):
5'– GATCGATATCITGCTSACMCARTGTCCAGC – 3' (SEQ ID NO: 2)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

C7F7LCR.KpnI (cebador inverso de la cadena liviana de 7D11):
5'– TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC– 3' (SEQ ID NO: 3)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

1D1(IIID–2)HCF.BsiWI (cebador delantero de la cadena pesada de 7D11):
5'– GATCGACGTACGCTGARGTGCARYTGGTGGARTCTGG– 3' (SEQ ID NO: 4)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

C7F7HCR.ApaI (cebador inverso de la cadena pesada de 7D1):
5'– ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT– 3' (SEQ ID NO: 5)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

Las reacciones de RT-PCR para las cadenas livianas y pesadas se llevaron a cabo usando un kit de RT-PCR un paso Qiagen (Cat # 210210) y las mezclas y condiciones de reacción sugeridas. Los vectores pRK para la expresión de IgG de las células de mamífero se han descripto previamente (Gorman et al., ADN Prot Eng Tech 2:3-10 (1990). Los vectores se han modificado y han incorporado ciertos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción endonucleasa para facilitar la clonación y expresión (Shields et al., *J Biol Chem 2000; 276: 6591–6604*). La VL amplificada se clonó en un vector de expresión de células de mamífero pRK que contiene el dominio constante kappa humano (pRK.LPG3.HumanKappa). La VH amplificada se insertó en un vector de expresión de células de mamífero pRK que codifica el dominio constante de IgG1 humano de longitud completa (pRK.LPG4.LPG4.Human).

Se obtuvo la secuencia de ADN para la región codificadora entera de la cadena liviana (Figura 1) y pesada (Figura 3) quiméricas humanas-murinas resultantes para el anti–FcRH5 humano (ch7D11). El polipéptido codificado para las cadenas liviana y pesada quiméricas humanas-

murinas codificadas por los ADN se muestran en las Figuras 2 y 4, respectivamente. Después de la secuenciación de ADN, se analizó la expresión de los plásmido.

Los plásmidos se transfectaron en forma transitoria en 293 (una línea celular renal embrionaria humana transformada con adenovirus (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977)). Específicamente, las células 293 se dividieron en día antes de la transfección, y se colocaron en un medio que contiene suero. En el día siguiente, se agregó ADN bicatenario preparado como precipitado de fosfato de calcio, seguido por ADN de pAdVAntage™ ADN (Promega, Madison, WI), y las células se incubaron toda la noche a 37°C. Las células se cultivaron en medio libre de suero y se recolectaron después de 4 días. Las proteínas del anticuerpo se purificaron a partir de los sobrenadantes de la célula transfectada en las columnas de proteína A y luego se intercambió el buffer en 10 mM de succinato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 6,0, y se concentró usando un Centricon-10 (Amicon). La identidad de las proteínas se confirmó por las secuenciación N-terminal. Se determinaron las concentraciones de proteína por análisis de aminoácidos cuantitativo. Los anticuerpos se analizaron para determinar la unión al FcRH5 humano por FACS en las células SVT2 que se describen a continuación.

2. Anticuerpo FcRH5 anti-humano quimérico 10A8 (ch10A8)

El anticuerpo 10A8 se derivó como miembros de un panel de hibridomas de anti–FcRH5 humano. Se construyeron quimeras ratón/humano de estos anticuerpos usando RT–PCR, como se describió anteriormente, para amplificar los dominios variables de las cadenas liviana y pesada del hibridoma usando ARNm total como sustrato. Los dominios variables de la cadena liviana se clonaron en el vector pRK.LPG3.HumanKappa que contiene el dominio constante kappa humano, mientra que los dominios variables de la cadena pesada se clonaron en el vector pRK.LPG4.HumanHC que codifica los dominios

constantes de IgG1 humana de longitud completa. La secuencia de ADN se obtuvo para región codificadora completa de la cadena liviana (Figura 7) y pesada (Figura 6) quiméricas humanas-murinas resultantes para el anti–FcRH5 humano (ch10A8), que permitió la identificación de las regiones estructurales y CDR de los dominios variables. El polipéptido codificado para las cadenas liviana y pesada quiméricas humanas-murinas de 10A8 codificadas por el ADN que se muestran en las Figuras 6 y 8, respectivamente.

Las secuencias de cebadores usados para la clonación de RT–PCR de 10A8 son las siguientes:

10A8LCF.EcoRV (cebador delantero de la cadena liviana de 10A8):
5'– GATCGATATCGTGATGACCCARTCTCAYAA– 3' (SEQ ID NO: 6)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8LCR.KpnI (cebador inverso de la cadena liviana de 10A8):
5'– TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC– 3' (SEQ ID NO: 7)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCF.BsiWI (cebador delantero de la cadena pesada de 10A8):
5'– GATCGACGTACGCTGARGTGCARYTG GTGGARTCTGG– 3'
(SEQ ID NO: 8)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCR (cebador inverso de la cadena pesada de 10A8):
5'–CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA – 3' (SEQ ID NO: 9)
(B=G/T/C , K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

3. <u>Anticuerpo FcRH5 anti-humano quimérico 13G9 (ch13G9)</u>

El anticuerpo 13G9 se derivó como miembros de un panel de hibridomas de anti–FcRH5 humano. Se construyeron quimeras ratón/humano de estos anticuerpos usando RT–PCR, como se describió anteriormente, para amplificar los dominios variables de las cadenas liviana y pesada del hibridoma usando ARNm total como sustrato. Los dominios variables de la cadena liviana se clonaron en el vector pRK.LPG3.HumanKappa que contiene el dominio constante kappa humano, mientra que los dominios variables de la cadena pesada se clonaron en el vector pRK.LPG4.HumanHC que codifica los dominios constantes de IgG1 humana de longitud completa. La secuenciación de ADN permitió la identificación de las regiones estructurales y CDR de los dominios variables. Las versiones quiméricas y humanizadas de 13G9 se describen en las solicitudes de patentes provisionales de U.S. Nos. 61/211.695 presentada en 1 de abril de 2009 y 61/166.214 presentada el 2 de abril de 2009, que se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

D. Generación de anticuerpo anti–FcRH5 humano 10A8

Los números de residuos están de acuerdo con Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of inmunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se usan abreviaturas de aminoácido de letra única. Las degeneraciones del ADN se representan usando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T).

1. Injerto de anticuerpo anti–FcRH5 humanizado

Se generaron varios anticuerpos anti–FcRH5 humanizados. Los dominios VL y VH del anticuerpo de FcRH5 murino (10A8) se alinearon con los dominios de kappa I de VL de consenso humano (huKI) y VH de consenso del subgrupo III humano VH (huIII). El alineamiento del dominio

variable de la cadena liviana de 10A8 murino con la secuencia de consenso humana kappa I es el que se muestra en la Figura 9. Las regiones hipervariables del 10A8 murino (mu10A8) se manipularon genéticamente en la estructura de consenso humana aceptora para generar un injerto de HVR directo de MA10A8 (en la presente denominado como "injerto de 10A8" o anticuerpo 'humanizado' injertado con 10A8" o "injerto de hu10A8"). Las CDR de 10A8 se manipularon genéticamente en un vector de expresión de mamífero que contiene una secuencia señal de mamífero, la secuencia de consenso para el dominio variable de kappa I V humano, y un dominio de kappa I constante humano. No se transfirieron residuos murinos desde el dador mAb al plásmido aceptor. Las CDR se transfirieron usando oligonucleótidos solos que codifican cada CDR, y los ADN del plásmido aceptor, siguiendo el protocolo de mutagénesis de Kunkle. Los residuos injertados, y el dominio variable de la cadena liviana de la versión 10A8 humana resultante (hu10A8 v1) (SEQ ID NO: 19), es la que se muestra en la Figura 9.

Asimismo, las CDR del dominio variable de la cadena pesada de 10A8 murino (mu10A8) se manipularon genéticamente en el vector que contiene la secuencia señal de mamífero, la secuencia de consenso del subgrupo III de cadena pesada humana y las secuencias que codifican los dominios constantes de IgG1 humana de longitud completa. No se transfirieron residuos murinos desde el dador al plásmido aceptor. Los alineamientos del dominio variable de la cadena pesada de 10A8, los residuos injertados del dominio variable del subgrupo III humano y la versión 1 de 10A8 humano resultante del dominio variable de la cadena pesada (hu10A8 v1) (SEQ ID NO: 21) es el que se muestra en la Figura 10.

En los estudios iniciales, la versión quimérica y humanizada 1 (hu10A8 v1) se transfirieron en forma transitoria en una línea celular de riñón embrionario humano transformado por adenovirus, 293 (Graham et al., 1977). Para cada variante, se añadieron 10 µg de plásmidos de

cadena liviana y pesada descriptos anteriormente a 0,9 ml de medio DMEM que contiene 0,1 ml de FuGene. Esta mezcla fue suficiente para añadir a matraz de T250 de 75% de células 293 confluentes con 24 ml de medio, y los matraces se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO_2. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y el medio se reemplazó con medio de expresión libre de suero con insulina y oligoelementos. Después de 5 días, se recolectó medio acondicionado y los anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad en ProteinA Sepharose.

Se midieron las afinidades de unión relativas de la versión humanizada 1 (hu10A8 v1) y la quimera por FACS y análisis de Scatchard (ver a continuación). Debido a que la afinidad de la versión humanizada 1 pareció equivalente a la quimera, no se obtuvieron versiones de 10A8 para aumentar la afinidad y los estudios posteriores se basan en esta versión y sus derivados conjugados (ver a continuación).

2. Producción de IgG

Los plásmidos se transfectaron en forma transitoria en 293 (una línea celular renal embrionaria humana transformada con adenovirus (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977)). En forma específica, las células 293 se dividieron el día antes de la transfección, y se incubaron en medio que contiene suero. En el día siguiente, se agregó ADN bicatenario preparado como precipitado de fosfato de calcio, seguido por ADN de pAdVAntage™ ADN (Promega, Madison, WI), y las células se incubaron toda la noche a 37°C. Las células se cultivaron en medio libre de suero y se recolectaron después de 4 días. Las proteínas del anticuerpo se purificaron a partir de los sobrenadantes de la célula transfectada en las moléculas de proteína A y luego se intercambió el buffer en 10 mM de succinato de sodio, 140 mM de NaCl, pH 6,0, y se concentró usando un Centricon-10 (Amicon). La identidad de las proteínas se confirmó por las secuenciación N-terminal. Se determinaron las concentraciones de proteína por análisis de aminoácidos cuantitativo. Los anticuerpos se

analizaron para determinar la unión al FcRH5 humano (TAHO5) por FACS en las células SVT2 como se describió anteriormente.

3. Análisis de unión (análisis FACS)

Para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos FcRH5, se analizaron la unión de las variantes de IgG a las células SVT2, que expresan FcRH1–6 humano usando análisis de FACS.

En breves palabras, se incubaron aproximadamente 10^6 células de células SVT2 que expresan en forma estable huFcRH1–6 marcado con gD en 100 µl con 1,0 ug de Ab murino o quimérico [Mu anti–gD (control positivo), Mu anti–FcRH5 (1H4) ("mu1H4"), Mu anti–FcRH5 (4D10) ("mu4D10"), Mu anti–FcRH5 (6H1) ("mu6H1"), Mu anti–FcRH5 (7D11) ("mu7D11"), Ch anti–FcRH5 (7D11) ("ch7D11"), Mu anti–FcRH5 (8H6) ("mu8H6"), Mu anti–FcRH5 (9E2) ("mu9E2"), o Mu anti–FcRH5 (13G9) ("mu13G9")]. La incubación de las células SVT2 que expresan en forma estable el vector vacío se llevó a cabo con los mismos anticuerpos y se usó como control negativo. El anti–MuIgG_1 de rata conjugado a PE, anti–MuIgG_{2a+b} de rata o Mu anti–HuIgG se usó como anticuerpo de detección secundario. Los resultados se muestran en la figura 14. Todos los anticuerpos analizados se unen específicamente a FcRH5, experto el anti–FcRH5 Mu (6H1), que reacciona en forma cruzada con FcRH1. Mu anti–FcRH5 (8H6) es un anticuerpo específico para FcRH5 pero débil, por análisis de FACS.

Para determinar adicionalmente la reactividad cruzada de los anticuerpos FcRH5, se analizó la unión de los sobrenadantes de las variantes de IgG a las células SVT2, que expresan FcRH1–6 humano por análisis de FACS.

En breves palabras, aproximadamente 10^6 células de células SVT2 que expresan en forma estable huFcRH1–6 marcado con gD se incubaron con 1,0 µg de anticuerpo Ms anti–gD purificado o 100 µl (concentración desconocida) de sobrenadante de hibridoma de Ab murino (Mu anti–

FcRH5 (10A8) ("mu10A8"), Mu anti–FcRH5 (10F5) ("mu10F5")). La incubación de las células SVT2 que expresan en forma estable el vector vacío se llevó a cabo con los mismos anticuerpos y se usó como control negativo. Se usó anti–MuIgG1 de rata conjugado a PE como el anticuerpo de detección secundario. Los resultados se muestran en la figura 15. Los anticuerpos mu10A8 y mu10F5 unen específicamente FcRH5.

Para determinar adicionalmente la unión de los anticuerpos FcRH5 de ratón, se analizó la unión de las variantes de IgG en las células Raji, que expresan FcRH5 humano y las células 293 que expresan FcRH5 de cynomologus, usando análisis de FACS.

En breves palabras, aproximadamente 10^6 células de Raji transfectadas en forma estable con FcRH5 humano y las células 293 transfectadas en forma transitoria con FcRH5 marcado con gD de cino se incubaron con 1,0 µg de de control de isotipo de ratón biotinilado, anti–gD mu biotinilado, mu6H1 biotinilado, mu13G9 biotinilado o mu7D11 biotinilado en 100µl de buffer de FACS (PBS, 0,5% BSA, 0,05% de azida sódica). Se usó estreptavidina conjugada con PE como el reactivo de detección secundario. Los resultados que se muestran en las Figuras 16 y 17.

Para el análisis adicional de FACS de los anticuerpos FcRH5, 1,0 µg, 0,1 µg o 0,01 µg de anticuerpo se titularon por un millón de células de células BJAB que expresan en forma estable huFcRH5 y células SVT2 que expresan en forma estable FcRH5 de cino. En breves palabras, aproximadamente 10^6 células en 100 µl se incubaron con cantidades varias (1,0 ug, 0,1 ug o 0,01 ug) de ne Ab mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5, o mu13G9 murinios por millón de células de células BJAB que expresan en forma estable huFcRH5 y células SVT2 que expresan en forma estable cinoFcRH5. La incubación con 1,0 ug/10^6 de células del control de isotipo de IgG Mu apropiado se usó como control negativol. anti–MuIgG_1 de rata conjugado a PE o anti–MuIgG_{2a+b} de rata se usó como el anticuerpo de detección secundario. Los resultados que

se muestran en las Figuras 18 y 19. mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5, o mu13G9 reaccionan en forma cruzada con FcRH5 de cinomolgus por análisis de FACS, y se pueden usar en estudios de seguridad preclínicos que evalúan la toxicidad dependiente del blanco.

Para el análisis de FACS de los conjugados del anticuerpo de FcRH5 y fármaco (ver Ejemplo 2), se añadieron ADC de FcRH5 en concentraciones crecientes (0,1, 1,0, y 10 µg/mL) a 10^6 de células OPM2 transfectadas y que expresan en forma estable FcRH5 humano o células SVT2 transfectadas y que expresan en forma estable FcRH5 de cinomolgus en un volumen de reacción de 100 µL. Luego las muestras se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en buffer de FACS (PBS, 0,5% BSA, 0,1% de azida sódica) para inhibir la internalización. Después del lavado, las células se resuspendieron en buffer de FACS y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con 20 µL de anticuerpo secundario IgG anti–humana de ratón conjugado a ficoeritrina (Ms anti–Humana–PE) en un volumen de reacción de 100 µL. Después del lavado, las células se fijaron en 200 µL de 2% paraformaldehído/PBS y se realizó citometría de flujo. Se usó el mismo procedimiento para HulgG, sin embargo, solo en la concentración más alta (10 µg/mL). El HulgG se usó como control de isotipo para ajustar el valor basal de PMT para la línea celular. Se realizó citometría de flujo en BD FACSCalibur® y se registró la media geométrica de la intensidad de fluorescencia para cada muestra. Los datos registrados se analizaron usando el software FlowJo v8,4,5 (ver lasFiguras 20–25). Tio–hu10A8–HC(A118C) y tio y tio–hu10A8–LC(V205C) se unen de modo similar a variadas concentraciones de anticuerpo no conjugado a las células OPM2 que expresan en forma estable huFcRH5 y las células SVT2 que expresan en forma estable FcRH5 de cinomolgus por análisis de FACS. Tio–ch10A8–HC(A118C)–MC–vc–PAB–MMAE, tio–hu10A8–HC(A118C)–MC–vc–PAB–MMAE, tio–hu10A8–LC(V205C)–MC–vc–PAB–MMAE, ch10A8–SPDB–DM4, y hu10A8–SPDB–DM4 se unen de modo similar a variadas concentraciones

de ADC a las células OPM2 que expresan en forma estable huFcRH5 por análisis de FACS.

4. Determinación de afinidad (Análisis de Scatchard)

Para determinar adicionalmente la unión de los anticuerpos FcRH5 murinos y los clones de IgG, se realizó el análisis de Scatchard de la unión de las variantes de IgG yodadas a las células OPM2 que expresan FcRH5 humano y las células SVT2 que expresan FcRH5 de cinomolgous.

En el análisis de Scatchard, 0,5 nM de anti–FcRH5 del clon murino marcado I^{125} o de IgG compitió contra anti–FcRH5 murino o marcado o clon de IgG, respectivamente, que varía de 50 a 0,02 nM (etapa 12, dilución seriada 1:2) en presencia de una línea OPM2 transfectada que expresa en forma estable FcRH5 humano y una línea SVT2 transfectada que expresa en forma estable FcRH5 de cinomolgous. Después de una incubación de cuatro horas a 4°C, las células se lavaron y se leyeron las cuentas del pelet celular con un contador gamma (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Walthem, MA). Todos los puntos se realizaron por triplicado y se contaron durante 10 minutos. La CPM promedio se usó para el cálculo de Kd usando el programa New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA). Los resultados se muestran en la Tabla 10 ("ms" se refiere a anticuerpo humano).

Tabla 10. Determinación de afinidad determinada por análisis de Scatchard.

Línea celular	PUR/Lot	Ab	Kd (nM)	Error est
BJAB.huFcRH5	50095–16	ms10A8	0,44	0,046
SVT2.ciFcRH5	50095–16	ms10A8	2,74	0,530
OPM2.huFc	PUR	ch10A8	0,52	0,036

RH5	15312			
SVT2.ciFcR	PUR			
H5	15312	ch10A8	0,98	0,022
OPM2.huFc	PUR	tio–		
RH5	16560	ch10A8.HC	0,85	0,050
SVT2.ciFcR	PUR	tio–		
H5	16560	ch10A8.HC	1,57	0,000
OPM2.huFc	CA51434–			
RH5	50	hu10A8 v1	1,44	0,150
SVT2.ciFcR	CA51434–			
H5	50	hu10A8 v1	3,04	1,340
OPM2.huFc	PUR	tio.hu10A8.H		
RH5	17978	C	1,77	0,240
OPM2.huFc	PUR			
RH5	17979	tio.hu10A8.LC	1,21	0,142
SVT2.ciFcR	PUR	tio.hu10A8.H		
H5	17978	C	3,12	0,139
SVT2.ciFcR	PUR			1032,3
H5	17979	tio.hu10A8.LC	2,63	00

BJAB.huFcR				
H5	50095–53	ms6H1	0,19	0,007
SVT2.ciFcR				
H5	50095–93	ms6H1	0,38	0,027

EJEMPLO 2: Generación de conjugados de anticuerpo anti–FcRH5 y fármaco (ADC)

Los fármacos usados para la generación de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anti–FcRH5 humano incluyeron derivados de maytansinoide DM1 y DM4 y dolastatina 10 monometillauristatina E (MMAE) y monometillauristatina F (MMAF). E

(MMAE). (Ver US20050276812, presentada el 31 de mayo de 2005 y US20050238649, presentada el 5 de noviembre de 2004,), los que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). DM1, DM4, y MMAE son inhibidores mitóticos que son al menos 100 veces más citotóxicos que los inhibidores mitóticos del alcaloide de la vinca usados en los tratamientos quimioterapéuticos del NHL (Doronina et al., *Bioconjug. Chem.,* 17:114–123 (2006); Doronina et al., *Nat. Biotechnol.,* 21: 778–784 (2003); Erickson et al., *Cáncer Res.,* 66: 4426–4433 (2006)).)). Los ligadores usados para la generación de los ADC fueron SMCC para DM1, SPDB para DM4 y MC para MMAF o MC–vc–PAB para MMAE. Para DM1 y DM4, los anticuerpos se ligaron a DM1 DM4a través del grupo ε-amino de lisina que usa el reactivo ligador tioéster de SMCC (denominado MCC después de la conjugación) Alternativamente, para DM4, los anticuerpos se ligaron a DM4 DM4a través del grupo ε-amino de lisina que usa el ligador SPDB. DM1 unido por un ligador SMCC es resistente a la escisión en condiciones reductoras. Además los ADC de SMCC–DM1 y SPDB–DM4 ADC inducen toxicidad celular si el ADC se internaliza y se dirige al lisosoma causando la liberación de la lisina-N^{ε}-DM1, que es un agente antimitótico efectivo en el interior de la célula, y cuando se libera de la célula, la lisisna-N^{ε}-DM1 es no tóxica (Erickson et al., *Cáncer Res.,* 66: 4426–4433 (2006)) Para MMAE, los anticuerpos se ligaron a MMAE a través de la cisteína por maleeimidocaproil-valina-citrulina (vc)-p-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB). El ligador MC-vc-PAB se puede escindir por proteasas intercelulares tales como catepsina B y cuando se escinde, libera el fármaco libre (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.,* 21: 778-784 (2003)) a la vez que el ligador MC puede ser resistente a la escisión por las proteasas intracelulares.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anti–FcRH5 humano, usando SMCC-DM1, se generaron de modo similar al procedimiento descripto en la solicitud US No. 11/141.344, presentada el 31 de mayo de 2005, que se incorpora en la presente por referencia en su

totalidad. Los anticuerpos anti–FcRH5 humano purificados se intercambiaron con el buffer en una solución que contiene 50 mM de fosfato de potasio y 2 mM de EDTA, pH 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se disolvió en dimetilacetamida (DMA) y se agregó a la solución del anticuerpo para obtener una relación molar final SMCC/Ab de 10:1. La reacción se dejó proceder durante tres horas a temperatura ambiente con mezclado. El anticuerpo modificado con SMCC posteriormente se purificó en una columna de desalinización GE Healthcare HiTrap (G-25) equilibrada en 35 mM de citrato de sodio con 150 mM de NaCl y 2 mM de EDTA, pH 6,0. Se agregó DM1, disuelto en DMA, a la preparación de anticuerpo SMCC para dar una relación molar de DM1 al anticuerpo de 10:1. La reacción se dejó proceder durante 4-20 horas a temperatura ambiente con mezclado. La solución de anticuerpo modificado con DM1 se diafiltró con 20 volúmenes de PBS para eliminar el DM1 sin reaccionar, se filtró en forma estéril y se conservó a 4 grados C. Normalmente, se obtuvo un rendimiento de 40-60% de anticuerpo mediante este proceso. La preparación fue usualmente >95% monomérica evaluada por filtración en gel y dispersión de luz láser. Debido a que DM1 tiene un máximo de absorción a 252 nm, la cantidad de fármaco unida al anticuerpo se podría determinar por mediciones de absorción diferencial a 252 y 280 nm. Normalmente, la relación del fármaco al anticuerpo fue de 3 a 4.

Para generar el conjugado de anticuerpo y fármaco anti–FcRH5 humano SPDB DM4 con 3–4 fármacos/Ab el anticuerpo se modificó primero con SPDB[éster del ácido 4–(2–Piridilditio)butírico de N–hidroxisuccinimida] para generar grupos ditiopiridilo. Se añadió un exceso molar de 4–6 veces de SPDB al anticuerpo y se dejó reaccionar durante 90 min a RT. La reacción se llevó a cabo en 50 mM de fosfato de potasio, pH 7 con 50 mM de NaCl, 2 mM de EDTA a una concentración de anticuerpo de 5–10 mg/ml. Después de la reacción de SPDB, se añadió etanol a una concentración final de 5% V/V y el fármaco DM4 que

contiene tiol se añade en un exceso molar de 1,7 veces respecto de SPDB. La incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 16 horas. El conjugado se purifica por diafiltración, filtración en gel o cromatografía de intercambio catiónico.

Los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) para anti–FcRH5 humano, usando fármaco ligador MC–val–cit (vc)–PAB–MMAE se generaron de modo similar al procedimiento descripto en la solicitud US No. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El anticuerpo anti–FcRH5 humano purificado se disolvió en 500 mM de borato de sodio y 500 mM de cloruro de sodio a pH 8,0 y se trató adicionalmente con un exceso de 100 MM de ditiotreitol (DTT). Después de la incubación a 37 grados C durante aproximadamente 30 minutos, el buffer se cambia por la elución en resina de Sefadex G25 y se eluye con PBS con 1 mM de DTPA. Se examinó el valor de tiol/Ab por la determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió en hielo. El ligador de fármaco, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE, en DMSO, se disolvió en acetonitrilo y agua, y se agregó al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de una hora de incubación, se agregó un exceso de maleimida para inactivar la reacción y se tapó cualquiera de los grupos tiol del anticuerpo. La mezcla de reacción se concentró por ultrafiltración centrífuga y el conjugado de anticuerpo y fármaco se purificó y desalinizó por la elución a través de la resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros 0,2 µm en condiciones estériles y se congeló para el almacenamiento.

EJEMPLO 3: Preparación de anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína

La preparación de anticuerpos anti–FcRH5 manipulados genéticamente en cisteína se realizó como se describe en la presente. Los residuos de cisteína se pueden añadir a la cadena liviana, la cadena pesada o la región de Fc de un anticuerpo para permitir la conjugación a varios fármacos. En la preparación del anticuerpo anti–FcRH5 manipulado genéticamente en cisteína 10A8, se mutagenizó el ADN que codifica la cadena liviana para sustituir la cisteína por valina en la posición de Kabat 205 que se muestra en la Figura 13. Se mutagenizó el ADN que codifica la cadena pesada para sustituir la cisteína por alanina en la posición EU 118 en la cadena pesada (posición secuencial 118, número de Kabat 114) ue se muestra en la Figura 12. La región de Fc de los anticuerpos anti–FcRH5 se puede mutagenizar para sustituir la cisteína por serina en la posición EU 400 en la región Fc de la cadena pesada (posición secuencial 400; número de Kabat 396).

EJEMPLO 4: : Ensayo de destrucción de células tumorales *in vivo* usando conjugados de anticuerpo anti–FcRH5 murino y fármaco

A. Xenoinjertos

Para ensayar la eficacia de los anticuerpos anti–FcRH5, anticuerpos anti-humanos murinos se conjugaron a DM1 y se analizó el efecto de la variante conjugada sobre los tumores.

Específicamente, se analizó la capacidad de los anticuerpos para la remisión de tumores en las células BJAB–luciferasa (línwa de células de linfoma de Burkitt transfectada con FcRH5 humano).

Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 en las células de BJAB–luciferasa y selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), las células sobrevivientes se autoclonaron por FACS para las que se expresan con rango medio con el anticuerpos anti–FcRH5 (7D11). Después de la autoclonación, se eligió línea celular de BJAB–luciferasa que expresa FcRH5 más estrechamente parecido a la expresión de las células plasmáticas, determinado por FACS por el análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (7D11). Como control negativo, se

usaron células BJAB–luciferasa transfectadas, de la misma manera con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe.

Para el análisis de eficacia de los anticuerpos de ratón, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células BJAB-luciferasa, por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 128 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores tenían un promedio de 100–250 mm^3 y cuando se administró la primera o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media $\pm$ DE. Grupos de 8-10 ratones se trataron con una dosis intravenoso (i.v.) semanal de 400 µg de anticuerpo–fármaco ligado/m^2 de ratón (correspondiente a ~8–10 mg de ADC /kg de ratón) con ADC de anti–FcRH5 o control de conjugado de anticuerpo y fármaco en el día 0 y día 7l. Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 2000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

Los ligadores entre el anticuerpo y la toxina que se usaron fueron el ligador de disulfuro tioéter SMCC para DM1. Los ligadores adicionales pueden incluir ligador disulfuro SPP o o el agente de entrecruzamiento de tioéter SMCC para DM1 o MC o MC-valina-citrulina(vc)-PAB o (un reactivo ligador de dipéptido valina-citrulina (vc))) que tiene un componente maleimida y un componente para-aminobenzilcarbamoído (PAB) autodestructivo para monometilauristatina E (MMAE) o

monometilauristatina F (MMAF). Las toxinas usadas fueron DM1. Las toxinas adicionales pueden incluir MMAE o MMAF. Los anticuerpos para este experimento incluyeron mu7D11, descripto en Chang et al. PCT/US2004/043514 (WO 2005/063299), que se incorpora por referencia en la presente en su totalidad, así como anti–FcRH5 descripto en la presente (ver Ejemplo 1B, tales como mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9, y mu9E2).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados anti–gp–120 (SMCC–DM1).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de BJAB–FcRH5

En un tratamiento de 48 días, con los conjugados y dosis del fármaco msostradas de los ADC de anti–FcRH5 mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9, y mu9E2, mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de BJAB-luciferasa en comparación con el control negativo, anti gp–120 SMCC–DM1. Los ADC se administraron en dos dosis (como se indica a continuación en la Tabla 11) en el día 0 y día 7 para todos los ADC y controles. En forma específica, todos los ADC de anti–FcRH5 ADCs inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (Figura 26).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 17 días en cada grupo de dosis. Los resultados (Figura 27) indicaron la administración de estos ADC anti–FcRH5 murino no causó una disminución significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo.

Aún adicionalmente, en la Tabla 11, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0) Remisión completa (CR, cuando en algún momento

después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm^3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 11.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco – DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**
Mu–anti–gp120	8/8	0	0	—	10,8	—
Mu–anti–gp120–mcc–dm1	8/8	0	0	400	8,4	3,2
Mu–anti–FcRH5 (7D11)	8/8	0	0	—	10,8	—
Mu–anti–FcRH5 (7D11)–mcc–dm1	8/8	0	0	400	9	3
Mu–anti–FcRH5 (6H1)–mcc–dm1	6/8	1	2	400	10,8	2,5
Mu–anti–FcRH5 (10A8)–mcc–dm1	7/8	3	1	400	10	2,7
Mu–anti–FcRH5 (13G9)–mcc–dm1	7/8	0	1	400	8,4	3,2
Mu–anti–FcRH5 (9E2)–mcc–dm1	8/8	2	0	400	10,4	2,6

EJEMPLO 5: Ensayo de inhibición del crecimiento tumoral in vivo por conjugados de anti–FcRH5 TioMab y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de los conjugados de hu10A8 tioMAb y fármaco con MC–vc–PAB–MMAE y conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4, se analizaron los efectos de los conjugados de 10A8 tioMab y fármaco y conjugados de 10A8 y fármaco sobre los tumores en ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad de los anticuerpos para remitir los tumores en las células OPM2 (Línea celular de mieloma múltiple) transfectadas en forma estable con FcRH5 humano.

Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 linealizadas en células OPM2 y selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), se separaron las células sobrevivientes para expresar FcRH5 en las células con anti–FcRH5,7D11 marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) y microesferas de anti-biotina MACS en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Después de la separación la expresión de FcRH5 se confirmó por análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (10A8) y y una línea celular OPM2 transfectada, de la misma manera, con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe como control negativo.

Para el análisis de eficacia de los conjugados de hu10A8 tioMAb y fármaco con MC–vc–PAB–MMAE y conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células OPM2–FcRH5 , por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 180 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores tenían un promedio de 100–250 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: $V= 0,5a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media $\pm$ SE. Grupos de 8 ratones se trataron con una dosis intravenoso única (i.v.) semanal de 2, 4, o 8 mg ADC/ kg con anti–FcRH5 ADC o control conjugados de anticuerpo y fármaco. Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales se midieron una vez por semana a lo largo de experimento. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los

protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados en anti–HER2 (HERCEPTIN®)(trastuzumab))(SPDB–DM4 y MC–vc–PAB–MMAE).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de OPM2–FcRH5

En un tratamiento de 35 días con los conjugados y las dosis de fármacos que se muestran en la Tabla 12, hu10A8 conjugado con SPDB–DM4 (Hu–anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4) y hu10A8 tioMAbs conjugado con MC–vc–PAB–MMAE ("tio–HC–hu–anti–FcRH5(10A8)–vc–E")mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de OPM2–FcRH5 en comparación con el control negativo, anti–HER2 humanizado conjugado con SPDB–DM4 (Hu–anti–HER2 (4D5)–SPDB–DM4) y anti–HER2 humanizado (4D5) tioMAb conjugado con MC–vc–PAB–MMAE ("tio–hu–anti–HER2 (4D5)–vc–E). Los ADC se administraron en una dosis única (como se indica en la Tabla 12) en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, todos los ADC de anti–FcRH5 humanizado y anti–FcRH5 tioMAb humanizado ADCs inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (Figura 28). Los conjugados basados en anti–HER2 se usaron como controles negativos ("Tio–hu–anti–Her2 (4D5)–vc–E" y "Anti–Her2 (4D5)–spdb–dm4").

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso en los primeros 14 días en cada grupo de dosis. Los resultados (Figura 29) indicaron que la administración de estos ADC de anti–FcRH5 humanizado y anti–FcRH5 tioMAb humanizado no causó reducción significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo.

Aún adicionalmente, en la Tabla 12, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial

(PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 12.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco – DM4 o MMAE ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco/Ab)**
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	—	n/a
Tio–hu–anti–Her2 (4D5)–vc–E	8/8	0	0	227	8	1,9
Anti–Her2 (4D5)–spdb–dm4	8/8	0	0	196	4	3,02
Tio–HC(A118C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–vc–E	7/8	2	1	112	4	1,94
Tio–HC(A118C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–vc–E	8/8	6	1	224	8	1,94
Tio–LC(L205C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–vc–E	8/8	4	0	109	4	1,89
Tio–LC(L205C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–vc–E	8/8	3	1	218	8	1,89
Hu–anti–FcRH5–10A8–spdb–DM4	8/8	2	1	98	2	3,13
Hu–anti–FcRH5–10A8–spdb–DM4	2/8	2	6	196	4	3,13

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, 240 mM de sacarosa, 0,02% de PS20

EJEMPLO 6: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de los conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4 ("hu–Anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4") a diferentes dosis, se analizaron los efectos de los anticuerpos conjugados sobre los tumores en ratones .

Específicamente, se examinó la capacidad de los anticuerpos de remitir los tumores en las células OPM2 (Línea celular de mieloma múltiple) transfectadas en forma estable con FcRH5 humano.

Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 linealizado en las células OPM2 y la selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), se separaron las células sobrevivientes para expresar FcRH5 en las células con anti–FcRH5,7D11 marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) y microesferas de anti-biotina MACS en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Después de la separación la expresión de FcRH5 se confirmó por análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (10A8) y una línea celular OPM2 transfectada, de la misma manera, con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe como control negativo.

Para el análisis de eficacia de los conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células OPM2–FcRH5, por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 180 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores tenían un promedio de 100–250 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se

indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: $V= 0,5a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media $\pm$ SE. Grupos de 9 ratones se trataron con una dosis intravenosa (i.v.) única que varía de 0,5 a 12 mg de ADC/kg con ADC de anti–FcRH5 o conjugados de anticuerpo y fármaco de control (ADC). Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales se midieron una vez por semana a lo largo del experimento. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados en anti–HER2 (HERCEPTIN®) (trastuzumab)) (SPDB–DM4).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de OPM2–FcRH5

En un tratamiento de 50 días con conjugados y dosis de fármacos que se muestran en la Tabla 13, anti–FcRH5 humanizado (10A8) (hu10A8) conjugado con SPDB–DM4 ("hu–anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4") mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de OPM2–FcRH5 en comparación con el control negativo, anti–HER2 humanizado conjugado con SPDB–DM4 ("hu–anti–HER2 (4D5)–SPDB–DM4")). Los ADC se administraron en una dosis única (como se indica en la Tabla 13) en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, 8 mg/kg y 12 mg/kg del ADC del anti–FcRH5 humanizado inhibieron significativamente crecimiento tumoral (Figura 30a).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso en los primeros 14 días en cada grupo de dosis. Los resultados (Figura 30b) indicaron que la administración de estos ADC de anti-FcRH5 humanizado y de anti-FcRH5 tioMAb humanizado no causaron reducción significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo.

Aún adicionalmente, en la Tabla 13, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 13.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco – DM4 ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**
Vehículo*	9/9	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu-Anti-Her2-SPDB DM4	9/9	0	0	587	12	3,02
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	30	0,5	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	60	1	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	119	2	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	2	1	238	4	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	1/8	1	8	477	8	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	0/9	4	9	715	12	3,8

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, 240 mM de sacarosa, 0,02% de PS20

EJEMPLO 7: Ensayo para la reducción de la proliferación celular in vitro con conjugados de anti–FcRH5 TioMab y fármaco

Se puede medir la potencia *in vitro* de los conjugados de hu10A8 y hu10A8 tioMAb (HC(A118C) y fármaco (que incluyen hu anti–FcRH5 (10A8)–desnudo, tio–HC(A118C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–desnudo, hu anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4, tio–HC(A118C)–hu–anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE) por un ensayo de proliferación celular con línea OPM2 transfectrada que expresan en forma estable FcRH5 humano (OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP,2). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible en el comercio (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (US 5583024; US 5674713; US 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina la cantidad de células viables del cultivo sobre la base de la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch et al., *J. Inmunol. Metho.*, 160: 81-88 (1993); US 6602677). El ensayo de CellTiter-Glo® se realiza en un formato de 96 pocillos, lo que lo hace apropiado para el análisis de alto rendimiento automatizado (HTS) (Cree et al., *AntiCáncer Drugs*, 6:398-404 (1995)). El procedimiento de ensayo homogéneo incluye la adición del reactivo solo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivados en medio suplementado con suero.

El formato "agregar-mezclar-medir" homogéneo produce lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante en la conversión concomitante de ATP a AMP y la generación de fotones. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa (RLU).

Los datos se pueden registrar con luminómetro o dispositivo de imágenes de cámara CCD. El resultado de luminiscencia se presenta como RLU, medido durante el tiempo. El % de RLU es el porcentaje de RLU normalizado en comparación con un control "conjugado no fármaco". En forma alternativa, los fotones de luminiscencia se pueden contar en un contador de centelleo en presencia de un centellador. Las unidades de luz se pueden representar luego como CPS (cuentas por segundo).

La eficacia de los conjugados de anticuerpo humanizado-fármaco se mide por un ensayo de proliferación celular que emplea el siguiente protocolo, adaptado del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., *Cáncer Res.*, 62: 5485-5488 (2002)):

1. Una alícuota de 50 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 75.000 células OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP,2 en el medio se deposita en cada pocillo de una placa de pared opaca de 96 pocillos.

2. Se añadió hu10A8 o tio–HC(A118C)–hu–anti–FcRH5 (10A8) Ab o ADC (50 ul) a los pocillos experimentales por triplicado hasta una concentración final de 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 14, 4,6 o 1,5 ng/mL, con pocillos "conjugado no fármaco" control que reciben medio solo y se incubaron durante 3 días.

3. Las placas se equilibran a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

4. Se agrega reactivo CellTiter-Glo (100 µl).

5. Los contenidos se mezclan durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir lisis celular.

6. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.

7. La luminiscencia se registra e informa en gráficos como % de RLU (unidades de luminiscencia relativas).

8. Como control, se corrió la misma línea celular en paralelo con no unión irrelevante hu–anti–Her2,4D5 Ab o ADC (que incluye hu–anti–Her2,4D5–Desnudo, hu–anti–Her2,4D5.HC.A118C–Desnudo hu anti–Her2,4D5–SPDB–DM4, hu anti–Her2,4D5.HC.A118C–MC–vc–PAB–MMAE).

Medio: las células OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP,2 se cultivan en RPMI1640/20% de FBS/2 mM de glutamina/1,0 µg/ml de puromicina.

La eficacia de los conjugados de anticuerpo y fármaco en ratón se muestra en las figuras 31 y 32. Los resultados de este ensayo se expresan en mg/ml como la IC50. La IC50 es la concentración del anticuerpo o ADC necesaria para un 50% de inhibición del crecimiento celular. hu10A8 no conjugado y tio–hu anti–FcRH5 (10A8)–HC(A118C) no muestran inhibición del crecimiento celular in vitro en las células OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP,2 con la IC50 de 10 mg/ml (el límite superior de la titulación de concentración del ensayo). Hu anti–FcRH5(10A8)–SPDB–DM4 y tio–hu anti–FcRH5(10A8)–HC(A118C)–MC–vc–PAB–MMAE mostraron la inhibición del crecimiento de las células OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 a las IC50 de 0,03 y 0,04 mg/ml, respectivamente. Por otra parte, hu anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4 causa completa inhibición del crecimiento de las células OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 a concentraciones mayores. De los anticuerpos de control y los ADC, solo hu anti–Her2,4D5–SPDB DM4 muestra la inhibición del crecimiento de las células OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 con una IC50 de 1,8 mg/ml. Como SPDB DM4 es un ligador de fármaco escindible, esta inhibición del crecimiento es más probablemente por actvidad del fármaco presencial.

EJEMPLO 8: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

SJO

Para analizar la eficacia del conjugado de (10A8) humanizado y fármaco (hu Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE) en combinación con Velcade® (bortezomib), se analizaron los efectos del anticuerpo conjugado, solo y en combinación con Velcade®, sobre los tumores (xenoinjerto de OPM2–FcRH5 de mieloma múltiple) en ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad del anticuerpo y Velcade® para remitir tumores en las células OPM2 (línea celular de mieloma múltiple) transfectadas en forma estable con FcRH5 humano. Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 linealizado en las células OPM2 y selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), se separaron las células sobrevivientes para expresar FcRH5 en las células con anti–FcRH5,7D11 marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) y microesferas de anti-biotina MACS en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Después de la separación la expresión de FcRH5 se confirmó por análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (10A8) y una línea celular OPM2 transfectada, de la misma manera, con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe como control negativo.

Para el análisis de eficacia de hu anti–FcRH5 10A8 conjugado con MC–vc–PAB–MMAE solo y en combinación con Velcade®, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células OPM2–FcRH , por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 331 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores alcanzaron 172–511 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media +

SE. Los ratones se aleatorizaron en nueve grupos de 9 ratones cada uno y se dosificaron. El grupo 1 recibió una inyección (IV) única de buffer de histidina el día 0 más inyecciones IV de 0,9% de cloruro de sodio (salina) dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10 como control de vehículo. El grupo 2 recibió una inyección (IV) única de 10 mg/kg de Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1135, en el día 0 como control de conjugado. El grupo 3 recibió inyecciones IV de 1 mg/kg Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. El grupo 4–5 recibió una inyección (IV) única de 4 o 10 mg/kg tio hu anti–FcRH5(10A8)–HC–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1465, respectivamente, en el día 0. El grupo 6–7 recibió una inyección (IV) única de 4 o 10 mg/kg hu anti–FcRH5(10A8)–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1575, respectivamente, en el día 0. El grupo 8 recibió una inyección (IV) única de 4 mg/kg de hu anti–FcRH5(10A8)–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1575, en el día 0 más inyecciones IV de 1 mg/kg Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales de los ratones se midieron dos veces por semana durante las primeras tres semanas. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados en anti–HER2 (HERCEPTIN®) (trastuzumab)) (MC–vc–PAB–MMAE).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de OPM2–FcRH5

En un tratamiento de 45 días con el conjugado de fármaco solo y en combinación con Velcade®, hu10A8 conjugado con –MC–vc–PAB–MMAE (hu anti–FcRH5(10A8)–MC–vc–PAB–MMAE) combinado con Velcade® mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de OPM2–FcRH5 en comparación con el control negativo,

conjugado de anti–Her2 humanizado con –MC–vc–PAB–MMAE (Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE) (Figura 39). Los ADC se administraron en una dosis única en el día 0 para todos los conjugados de fármacos y controles. Se administró Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. Adicionalmente, 4 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE en combinación con 1 mg/kg de Velcade® inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el los grupos de agente solo dosificados con Tio Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE a 4 y 10 mg/kg, Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE a 4 y 10 mg/kg, y Velcade® a 1 mg/kg (Figura 39).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 24 días en cada grupo de dosis (Figura 40). Los resultados indicaron que la administración de Velcade® causó disminución del peso corporal o pérdida de peso durante el tratamiento, pero el rebote de peso después de la dosificación fue completa.

Aún adicionalmente, en la Tabla 14, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 14.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco MMAE ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**

Vehículo*	9/9	0	0	N/A	N/A	N/A
Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE	9/9	0	0	432	10	2,9
Velcade®	9/9	0	0	N/A	1	N/A
Tio Hu anti–FcRH5 10A8 HC–MC–vc–PAB–MMAE	9/9	0	0	112	4	1,94
Tio Hu anti–FcRH5 10A8 HC–MC–vc–PAB–MMAE	9/9	3	0	280	10	1,94
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE	9/9	0	0	198	4	3,44
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE	9/9	6	0	496	10	3,44
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE (4 mg/kg) + Velcade® (1 mg/kg)	7/8	6	3	496	4 / 1	3,44 / N/A

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, 240 mM de sacarosa, 0,02% PS20, pH 5,5

EJEMPLO 9: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de conjugado de fármaco humanizado (10A8) (Hu Anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4) en combinación con Velcade®, se analizaron los efectos del anticuerpo conjugado, solo y en combinación con Velcade®, sobre los tumores (xenoinjerto de OPM2–FcRH5 de mieloma múltiple) en ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad del anticuerpo y Velcade® para remitir tumores en las células OPM2 (Línea celular de mieloma múltiple) transfectada en forma estable con FcRH5 humano.

Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 linealizado en las células OPM2 y la selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), se separaron las células sobrevivientes para expresar FcRH5 en las células con anti–FcRH5,7D11 marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) y microesferas de anti-biotina MACS en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Después de la separación la expresión de FcRH5 se confirmó por análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (10A8) y una línea celular OPM2 transfectada, de la misma manera, con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe como control negativo.

Para el análisis de eficacia de Hu anti–FcRH5 10A8 conjugado a –SPDB–DM4 solo y en combinación con Velcade®, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células OPM2–FcRH5 , por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 306 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores alcanzaron 197–499 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media + SE. Los ratones se aleatorizaron en seis grupos de 9 ratones cada uno y se dosificaron. El grupo 1 recibió inyecciones intravenosas (IV) de 1 mg/kg Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. El grupo 2 recibió una inyección (IV) única de buffer de histidina en el día 0 plus inyecciones IV de 0,9% cloruro de sodio (salina) dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10 como control de vehículo. El grupo 3 recibió una inyección (IV) única de 4 mg/kg de Hu anti–Her2 Trastuzumab–SPDB–DM4, CNJ 1433, en el día 0 como control de

conjugado. El grupo 4 recibió una inyección (IV) única de 4 mg/kg Hu de anti–FcRH5 10A8 SPDB–DM4, CNJ 1503, en el día 0. El grupo 5 recibió una inyección (IV) única de 4 mg/kg de Hu anti–Her2 Trastuzumab–SPDB–DM4, CNJ 1433, en el día 0 más inyecciones IV de 1 mg/kg Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. El grupo 6 recibió una inyección (IV) única de 4 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8 SPDB–DM4, CNJ 1503, en el día 0 plus inyecciones IV de 1 mg/kg Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales de los ratones se midieron dos veces por semana durante las primeras tres semanas. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados en anti–HER2 (HERCEPTIN®) (trastuzumab)) (SPDB–DM4).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de OPM2–FcRH5

En un tratamiento de 37 días con el conjugado de fármaco solo y en combinación con Velcade®, anti–FcRH5 humanizado (10A8) conjugado con –SPDB–DM4 (Hu anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4) combinado con Velcade® mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de OPM2–FcRH5 en comparación con el control negativo, conjugado de anti–Her2 humanizado con –SPDB–DM4 (Hu anti–Her2 Trastuzumab– SPDB–DM4.) (Figura 41) Los ADC se administraron en una dosis única en el día 0 para todos los conjugados de fármacos y controles. Se administró Velcade® dos veces por semana durante dos semanas en los días 0, 3, 7, y 10. Adicionalmente, 4 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4 en combinación con 1 mg/kg de Velcade® inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en

comparación con el grupo dosificado con el agente solo con Hu anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4 a 4 mg/kg y Velcade® a 1 mg/kg y el grupo de combinación dosificado con Hu anti–Her2 Trastuzumab–SPDB–DM4 más Velcade® a 1 mg/kg. (Figura 41).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 21 días en cada grupo de dosis. (Figura 42) Los resultados indicaron que la administración del anti–FcRH5 humanizado ADC y Velcade® no causó reducción significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo.

Aún adicionalmente, en la Tabla 15, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 15.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco DM4 ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**
Velcade®	**8/8**	**0**	**0**	**N/A**	**N/A**	**N/A**
Vehículo*	**9/9**	**0**	**0**	**N/A**	**N/A**	**N/A**
Hu anti–Her2 Trastuzumab–SPDB–DM4	**8/8**	**0**	**0**	**195**	**4**	**3,02**
Hu anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4, 4 mg/kg	**9/9**	**1**	**0**	**238**	**4**	**3,8**
Hu anti–Her2 Trastuzumab–SPDB–DM4 + Velcade®	**8/8**	**0**	**0**	**195 / N/A**	**4 / 1**	**3,02 / N/A**

Hu anti–FcRH5 10A8–SPDB–DM4 06 + Velcade®	**1/9**	**1**	**8**	**238 / N/A**	**4 / 1**	**3,8 / N/A**

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, 240 mM de sacarosa, 0,02% PS20, pH 5,5

EJEMPLO 10: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de conjugado de (10A8) humanizado y fármaco (Hu Anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE) en combinación con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona, se analizaron los efectos del anticuerpo conjugado en combinación con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona, en tumores (xenoinjerto de OPM2–FcRH5 de mieloma múltiple) de ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad del anticuerpo en combinación con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona para remitir tumores en las células OPM2 (línea celular de mieloma múltiple) transfectada en forma estable con FcRH5 humano. Después de la transfección de pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 linealizado en las células OPM2 y la selección con puromicina (Calbiochem, San Diego, CA), se separaron las células sobrevivientes para expresar FcRH5 en las células con anti–FcRH5,7D11 marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, Il) y microesferas de anti-biotina MACS en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Después de la separación la expresión de FcRH5 se confirmó por análisis de FACS usando anticuerpos anti–FcRH5 (10A8) y una línea celular OPM2 transfectada, de la misma manera, con el vector vacío pRK.CMV.PD.nbe como control negativo.

Para el análisis de eficacia de Hu anti–FcRH5 10A8 conjugado a –MC–vc–PAB–MMAE en combinación con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía

subcutánea con 2 X 10^7 células OPM2–FcRH5, por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 446 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores alcanzaron 263–630 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media + SE. Los ratones se aleatorizaron en nueve el grupos de 8 ratones cada uno y se dosificaron. El grupo 1 recibió inyecciones intraperitoneales (IP) diarias de una mezcla de DMSO y buffer de MCT en los días 0–13 como control de vehículo. El grupo 2 recibió una inyección intravenosa (IV) única de 6 mg/kg de Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1135, en el día 0 como control de conjugado. El grupo 3 recibió una inyección (IV) única de 6 mg/kg Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1672, en el día 0. El grupo 4 recibió inyecciones IP diarias de 50 mg/kg Revlimid® en los días 0–13. El grupo 5 recibió una dosis oral (PO) diaria de 3 mg/kg dexametasona durante cuatro días seguido por tres días suspendido durante dos ciclos en los días 0–3 y 7–10. El grupo 6 recibió inyecciones IP diarias de 50 mg/kg de Revlimid® en los días 0–13 más dosis PO diaria de 3 mg/kg de dexametasona durante cuatro días seguido por tres días suspendida por dos ciclos en los días 0–3 y 7–10. El grupo 7 recibió una inyección (IV) única de 6 mg/kg de Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1135, en el día 0 más inyecciones IP diarias de 50 mg/kg de Revlimid® en los días 0–13 y dosis PO diaria de 3 mg/kg de dexametasona durante cuatro días seguido por tres días suspendido por dos ciclos en los días 0–3 y 7–10. El grupo 8 recibió una inyección (IV) única de 6 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ

1672, en el día 0 más inyecciones IP diarias de 50 mg/kg de Revlimid® en los días 0–13 y dosis PO diaria de 3 mg/kg de dexametasona durante cuatro días seguido por tres días suspendido por dos ciclos en los días 0–3 y 7–10. El grupo 9 recibió una inyección (IV) única de 6 mg/kg Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE, CNJ 1672, en el día 0 más inyecciones IP diarias de 50 mg/kg Revlimid® en los días 0–13. Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales de los ratones se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Si los ratones experimentaron una pérdida de peso corporal de más de 15% en comparación con su peso corporal en el día 0, los ratones se pesaron en forma diaria hasta recuperar peso o hasta que la pérdida de peso corporal fue mayor de 20%. Los ratones se sacrificaron cuanto tuvieron una pérdida de peso corporal mayor de 20% en comparación con su peso corporal en el día 0, antes de que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3, o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugado basado en anti–HER2 (HERCEPTIN®) (trastuzumab) (MC–vc–PAB–MMAE).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de OPM2–FcRH5

En un tratamiento de 38 días con el conjugado de fármaco en combinación con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona, anti–FcRH5 humanizado (10A8) conjugado con –MC–vc–PAB–MMAE (Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE) combinado con Revlimid® y Revlimid® más dexametasona mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores de OPM2–FcRH5 en comparación con el control negativo, anti–HER2 humanizado conjugado con –MC–vc–PAB–MMAE (Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE). (Figura 43) Los ADC se administraron en una dosis única en el día 0 para todos los conjugados de

fármacos y controles. Se administró Revlimid® como inyecciones IP diarias de 50 mg/kg de Revlimid® en los días 0–13. La dexametasona se administró en forma de dosis PO diarias de dexametasona durante cuatro días seguido por tres días suspendido en dos ciclos de los días 0–3 y 7–10. Adicionalmente, 6 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE en combinación con 50 mg/kg de Revlimid® y 6 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE en combinación con 50 mg/kg de Revlimid® más 3 mg/kg dexametasona inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo dosificado con el agente solo con 6 mg/kg de Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE, 50 mg/kg de Revlimid® (lenalidomida) y 3 mg/kg de dexametasona. (Figura 43).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 17 días en cada grupo de dosis. (Figura 44) Los resultados indicaron que la administración de dexametasona y Revlimid® causó una disminución significativa del peso corporal o pérdida de peso.

Aún adicionalmente, en la Tabla 16, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 16.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco**	**Dosis de Ab**	**Relación del**

				MMAE ($\mu g/m^2$)	**(mg/kg)**	**fármaco (Fármaco /Ab)**
Vehículo (DMSO + buffer de MCT)	7/7	0	0	N/A	N/A	N/A
Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE (iv única)	8/8	0	0	259	6	2,9
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE (iv única)	7/7	2	0	294	6	3,4
Revlimid (ip qdX13)	4/4	0	0	N/A	50	N/A
dexametasona (po qdX4 para 3 ciclos en un esquema 4/3/4/3/4e)	5/5	0	0	N/A	3	N/A
Revlimid + dexametasona	5/5	3	0	N/A	50 / 3	N/A
Hu anti–Her2 Trastuzumab–MC–vc–PAB–MMAE + Revlimid, + dexametasona	6/6	4	0	259	6 / 50 / 3	108
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE + Revlimid + dexametasona	4/4	8	0	294	6 / 50 / 3	3,4
Hu anti–FcRH5 10A8–MC–vc–PAB–MMAE + Revlimid	4/4	8	0	294	6 / 50	3,4

La siguiente memoria descriptiva se considera que es suficiente para permitir al experto en la técnica practicar la invención. La presente invención no está limitada en alcance por el constructo depositado, debido a que la forma de realización depositada se considera como una mera ilustración de ciertos aspectos de la invención y cualquiera de los constructos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de esta invención. El depósito de material de la presente no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente es inadecuada para permitir la práctica de algún aspecto de la invención, lo que incluye el mejor modo de este, ni se interpreta como una

limitación del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que esta representa. En efecto, varias modificaciones de la invención además de las que se muestran y describen en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y se incluyen en el alcance de las reivindicaciones anexas,

Ejemplo 11: Producción y caracterización de anticuerpos biespecíficos FcRH5

Construcción y producción de anticuerpos anti–CD3/FcRH5 biespecíficos. La construcción de un anticuerpo de FcRH5 biespecífico, específicamente un anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico protuberancia dentro de la cavidad se describe a continuación.

Varios anticuerpos biespecíficos protuberancia dentro de la cavidad se han descripto anteriormente. *Ver, por ejemplo*, patentes U.S. Nos. 5.731.168 y 7.183.076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617–621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26–35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677–681 (1998). En ciertos casos, la interfaz C_H3 entre la quimera humanizada anti–CD3/CD4–IgG previamente descripta por Chamow *et al.* J. Inmunol. 153:4268 (1994) fue manipulada genéticamente para maximizar el porcentaje de heteromultímeros que podrían recuperarse de las líneas celulares de mamíferos cotransfectadas con los constructos de expresión. Como se usa en la presente, "heteromultímeros" se refiere a una molécula, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido.

Como se describe en los documentos citados en el párrafo precedente, la estrategia usada para dirigir la formación de heteromultímeros residió en introducir una o más mutaciones de "protruberancia" en un primer polipéptido, por ejemplo, el dominio C_H3 de una cadena H del anticuerpo,y también introducir una o más mutaciones de "cavidad" correspondientes en un segundo polipéptido, por ejemplo, el

dominio C_H3 de una segunda cadena H del anticuerpo. Una mutación en la "protuberancia" reemplazó un aminoácido pequeño con uno más grande y una mutación en la "cavidad" reemplazó un aminoácido grande con uno más pequeño. Por otra parte, además de las mutaciones en protuberancia y cavidad, se introdujeron residuos que contienen tiol libre en la interfaz de dos polipéptidos, por ejemplo, dos dominios C_H3, los que demostraron aumentar la formación de heteromultímeros. Se han descripto varios ejemplos de mutaciones en la protuberancia dentro de la cavidad y residuos que contiene tiol libre introducidos en las interfases del polipéptido. *Ver, por ejemplo*, patentes U.S. Nos. 5.731.168 y 7.183.076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617–621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26–35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677–681 (1998).

Las siguientes etapas se llevan a cabo para producir un anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico. Se construyen plásmidos de expresión de *E. coli* que codifican variantes de cadena liviana (L) y pesada (H) anti–CD3 humanizadas del Ab UCHT1 monoclonal anti–CD3 murino (patentes U.S. Nos. 5.821.337 y 6.407.213; Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217 [1992] y Rodrigues *et al.*, *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7: 45 [1992]). Muchos plásmidos de expresión de *E. coli* adecuados son conocidas en la a técnica, que incluyen pAK19. Carter et al., Bio/Tehcnology 10:163–167 (1992). La introducción de una mutación en una protuberancia o una cavidad del dominio C_H3 (como se describió anteriormente) de la cadena H anti–CD3 humanizado, se realiza por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio. Los métodos de mutagénesis dirigidos al sitio son bien conocidos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367–382 (1987). Además, se construyen los plásmidos de expresión de *E. coli* que codifican las cadenas liviana y pesada de anti–FcRH5 humanizado, tal como las cadenas livianas y pesadas de anti–FcRH5 humanizado descriptas en la presente. La introducción de una mutación en una cavidad correspondiente (si el dominio de C_H3 anti–CD3 tiene una mutación en la protuberancia) o en una protuberancia correspondiente (si

el dominio C_H3 anti–CD3 tiene una mutación en la cavidad) del dominio C_H3 (como se describió anteriormente) de la cadena H del anti–FcRH5 humanizado se realiza, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio.

Los anticuerpos biespecíficos anti–CD3/FcRH5 se producen por la transformación de los plásmidos de expresión de *E. coli* descriptos anteriormente en una cepa de *E. coli* apropiada, por ejemplo, 33B6, usando métodos bien conocidos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, Rodrigues et al., Cáncer Res. 55:63–70 (1995). El anticuerpo se secreta por *E. coli* transformado cultivada en un fermentador de 10 L como se describió previamente. Carter et al., Bio/Technology 10:163–167 (1992). Los anticuerpos se purifican y analizan usando procedimientos en la técnica. Ver, por ejemplo, Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26–35 (1997).

Ensayo de unión celular: para evaluar la capacidad de anticuerpos anti–CD3/FcRH5 biespecíficos para unir las células B y células T, las células blancas de sangre periférica humana se aíslan de sangre entera de dadores sanos usando un gradiente de Ficoll de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica. Aproximadamente 1 millón de células se incuban con anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico en hielo en un buffer que contiene 0,5% de BSA y 2 mM de EDTA en PBS. Las células luego se lavan y tiñen con (Fab')2 de IgG anti-humana de cabra conjugada con FIT, junto con anticuerpos anti–CD8–APC y anti–CD138–PE y anti–CD38–PerCP–Ci5 siguiendo el protocolo del fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA). Las actividades de unión se evalúan en un ensayo basado en FACS usando citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Diego, CA) y el análisis se realiza usando un software Flowjo (TreeStar Ashland, O).

Ensayo de destrucción celular *in vitro*: Las células de mieloma múltiple EJM–FcRH5.LSP.2 (células EJM, DSMZ ACC–560, transfectadas en forma estable con FcRH5 humano) se usan como células blanco y se cocultivan con células blancas de sangre periférica humanas totales o células T CD8+. Si se usan células T CD8+, se purifican de PBMC

humanos por separación negativa usando un kit de aislamiento de células T CD8+, (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) en placas de parte inferior curva de 96 pocillos. Se añaden 20.000 células EJM–FcRH5.LSP.2 por pocillo con una relación de células blanco: efectoras = 1:10, con o sin anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico. Después de aproximadamente 19 horas, las células se tiñen con anti–CD38–marcado con FITC y anti–CD138–PE siguiendo el protocolo del fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA) y se mezcló con microesferas YG de 6 micrones de calidad de calibración Fluoresbrite® (Polisciences, Inc., Warrington, PA). El análisis de FACS se realiza por la activación de los dispersores frontal/lateral y la tinción con CD38–CD138. Las células muertas se excluyen usando tinción de yoduro de propidio de acuerdo con los procedimientos del protocolo. La actividad de destrucción específica del anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación: % de destrucción específica = (1– número de células vivas EJM–FCRH5.LSP.2 con tratamiento / cantidad de células EJM–FCRH5.LSP.2 vivas en el efector & EJM–FCRH5.LSP.2 sin anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico) x 100.

Eficacia *in vivo*: Las células de mieloma múltiple EJM–FcRH5.LSP.2 se mezclan con células mononucleares de sangre periférica y se inyectan por vía subcutánea en el flanco torácio derecho de las ratas hembra NOD.CD17–*Prkdc*^{scid}/J (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA). Los ratones inoculados luego se separan aleatoriamente en grupos control y de tratamiento. A los grupos control se administra vehículo o anticuerpo biespecífico de control anti–CD3/Her2. A los grupos de tratamiento se administra el anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos se administran en un rango de 0,01 a 10 mg/kg. El control o tratamiento se administra por vía intravenosa dentro de 1–2 horas después de la inoculación celular y se repite diariamente durante 5 días consecutivos. Los tumores se miden en dos dimensiones (longitud y ancho) usando calibres dos veces por semana. Los ratones se controlan clínicamente dos veces por semana. Al fin del experimento, el tamaño del

tumor de los animales tratados con el control se compara con el tamaño del tumor de los animales tratados con el anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico para evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpo anti–CD3/FcRH5 biespecífico.

EJEMPLO 12: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de conjugados de hu10A8 y fármaco con MC–vc–PAB–MMAE ("hu–Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE") a diferentes dosis, se analizaron los efectos de los anticuerpos conjugados sobre los tumores en ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad de los anticuerpos de remitir los tumores en las células EJM (línea celular de mieloma múltiple) transfectadas en forma estable con FcRH5 humano.

Las células EJM (ACC–560) son una línea celular de mieloma múltiple humano disponible en el comercio de DSMZ (Alemania). Como las células EJM no expresan en forma endógena FcRH5, las células EJM se transfectaron en forma estable con FcRH5 humano, lo que origina la línea celular EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2.

Para el análisis de eficacia de los conjugados de hu10A8 y fármaco con MC–vc–PAB–MMAE, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células EJM2–FcRH5.LSP.2, por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 134 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores tenían un promedio de 100–250 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: V= 0,5a X b^2,

527

donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media ± SE. Los grupos de 8 ratones se trataron con una dosis intravenosa (i.v.) única que varía de 1 a 8 mg de ADC/kg con ADC de anti–FcRH5 o conjugados de anticuerpo y fármaco control (ADC). Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales de los ratones se midieron una vez por semana durante 2 semanas. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron el conjugado basado en anti–HER2 (HERCEPTIN® (trastuzumab)) (MC–vc–PAB–MMAE).

B. Resultados

1 Xenoinjertos de EJM–FcRH5.LSP.2

En un tratamiento de 80 días con los conjugados y las dosis de fármacos que se muestran en la Tabla 17, anti–FcRH5 humanizado (10A8) (hu10A8) conjugado con MC–vc–PAB–MMAE ("hu–anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE") mostró inhibición del crecimiento tumoral en los ratones SCID con tumores de EJM–FcRH5.LSP.2 en comparación con el control negativo, anti–HER2 humanizado conjugado con MC–vc–PAB–MMAE ("Hu–anti–HER2 (4D5)–MC–vc–PAB–MMAE"). Los ADC se administraron en una dosis única en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, todos los niveles de dosis del ADC anti–FcRH5 humanizado inhibieron significativamente el crecimiento tumoral (Figura 45).

Además, en el mismo estudio se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 7 días en cada grupo de dosis. Los resultados indicaron que la administración de estos ADC de anti–FcRH5

humanizado. Los ADC no causaron reducción significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo (Figura 46).

Aún adicionalmente, en la Tabla 17, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 17.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco – DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu–Anti–Her2–MC–vc–PAB–MMAE	8/8	0	0	346	8	2,9
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE	4/6	1	2	49	1	3,4
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE	3/5	2	3	98	2	3,4
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE	8/8	7	1	196	4	3,4
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–MC–vc–PAB–MMAE	1/5	2	6	392	8	3,4

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, 240 mM de sacarosa, 0,02% PS20

EJEMPLO 13: Ensayo para la inhibición del crecimiento tumoral in vivo por los conjugados de anti–FcRH5 humanizado y fármaco

A. Xenoinjertos

Para analizar la eficacia de los conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4 ("hu–Anti–FcRH5 (10A8)– SPDB–DM4") a diferentes dosis, se analizaron los efectos de los anticuerpos conjugados sobre los tumores en ratones.

Específicamente, se examinó la capacidad de los anticuerpos de remitir los tumores en las células EJM (línea celular de mieloma múltiple) transfectada en forma estable con FcRH5 humano.

Las células EJM (ACC–560) son de una línea celular de mieloma múltiple humano disponible en el comercio que se obtiene de DSMZ (Alemania). Como las células EJM no expresan en forma endógena FcRH5, las células EJM se transfectaron en forma estable con FcRH5 humano, dando origen la línea celular EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2.

Para el análisis de eficacia de los conjugados de hu10A8 y fármaco con SPDB–DM4, se inocularon ratones hembra CB17 ICR SCID (6-8 semanas de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) por vía subcutánea con 2 X 10^7 células EJM2–FcRH5.LSP.2, por medio de inyección en los flancos de ratones CB17 ICR SCID y los tumores de xenoinjerto se dejaron crecer hasta un promedio de 134 mm^3. El día 0 se refiere al día en que los tumores tenían un promedio de 100–250 mm^3 y cuando se administró la primera/o única dosis de tratamiento, a menos que se indique específicamente otra cosa a continuación. Se calculó el volumen tumoral sobre la base de dos dimensiones, medidas mediante calibres, y se expresó en mm^3 de acuerdo con la fórmula: $V= 0,5a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente, respectivamente. Los datos recolectados de cada grupo experimental se expresaron como media $\pm$ SE. Los grupos de 8 ratones se trataron con una dosis intravenosa (i.v.) única que varía de 2 a 8 mg de ADC/kg de ADC con anti–FcRH5 o conjugados de anticuerpo y fármaco control

(ADC). Los tumores se midieron dos veces por semana a lo largo del experimento. Los pesos corporales de los ratones se midieron una vez por semana durante 2 semanas. Los ratones se sacrificaron antes que los volúmenes del tumor alcanzaran 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraron signos de ulceración inminente. Todos los protocolos de animales fueron aprobados por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Los controles negativos incluyeron conjugados basados en anti–HER2 (HERCEPTIN® (trastuzumab)) (SPDB–DM4).

B. Resultados

1. Xenoinjertos de EJM–FcRH5.LSP.2

En un tratamiento de 24 días con los conjugados y las dosis de fármacos que se muestran en la Tabla 18, anti–FcRH5 humanizado (10A8) (hu10A8) conjugado con SPDB–DM4 ("hu–anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4") mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores EJM–FcRH5.LSP.2 en comparación con el control negativo, anti–HER2 humanizado conjugado con SPDB–DM4 ("Hu–anti–HER2 (4D5)–SPDB–DM4"). Los ADC se administraron en una dosis única en el día 0 para todos los ADC y controles. Específicamente, 8 mg/kg del ADC de anti–FcRH5 humanizado inhibieron significativamente crecimiento tumoral (Figura 47).

Además, en el mismo estudio, se determinó el porcentaje de cambio de peso corporal en los primeros 7 días en cada grupo de dosis. Los resultados indicaron que la administración de estos ADC anti–FcRH5 humanizado no causaron reducción significativa del peso corporal o pérdida de peso durante este tiempo (Figura 48).

Aún adicionalmente, en la Tabla 18, se indica el número de ratones respecto del número total de ensayados que muestra regresión parcial (PR, cuando el volumen del tumor en algún momento después de la administración disminuyó por debajo del 50% del volumen de tumor medido en el día 0), Remisión completa (CR, cuando en algún momento

después de la administración el volumen del tumor disminuyó a 0 mm3) (NA = No aplicable); (TI = número de tumores observables al fin del estudio).

Tabla 18.

Anticuerpo administrado (Tratamiento)	**TI**	**PR**	**CR**	**Dosis del fármaco – DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Dosis de Ab (mg/kg)**	**Relación del fármaco (Fármaco /Ab)**
Vehículo*	8/8	0	0	n/a	n/a	n/a
Hu–Anti–Her2–SPDB–DM4	8/8	0	0	391	8	3,02
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4	8/8	0	0	119	2	3,8
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4	7/8	0	1	238	4	3,8
Hu–Anti–FcRH5 (10A8)–SPDB–DM4	8/8	2	0	476	8	3,8

* Vehículo = acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, 240 mM de sacarosa, 0,02% PS20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti–FcRH5 que comprende:

(a) al menos una secuencia de HVR seleccionada del grupo que consiste en:

(i) HVR–L1 que comprende la secuencia KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR–L2 que comprende la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR–L3 que comprende la secuencia QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR–H1 que comprende la secuencia GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 35)

(v) HVR–H2 que comprende la secuencia ATISSGGSLTFILDSVR (SEQ ID NO: 36)

(vi) HVR–H3 que comprende la secuencia PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 37); y

(b) al menos una variante de HVR, en donde la variante de HVR comprende la modificación de al menos un residuo de la secuencia descripta en la SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 o 37.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una porción de la secuencia estructural es una secuencia estructural de consenso humana.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha modificación es substitución, inserción o supresión.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una HVR–H2 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 36.

5. un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es sustancialmente igual a la afinidad monovalente de un anticuerpo humano que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

6. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino o quimérico que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

7. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad monovalente del anticuerpo al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor que la afinidad monovalente de un anticuerpo murino o quimérico que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

8. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es sustancialmente igual que la afinidad de un anticuerpo humano en su forma bivalente y que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

9. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado, en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor que la afinidad de un anticuerpo murino o

SSA

quimérico en su forma bivalente y que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

10. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 veces menor que la afinidad de un anticuerpo murino o quimérico en su forma bivalente que comprende una secuencia variable de la cadena liviana y la cadena pesada como se describe en la Figura 9 (SEQ ID NO: 18) y la Figura 10 (SEQ ID NO: 20).

11. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,4 nM.

12. El anticuerpo anti–FcRH5 humanizado de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,4 nM +/– 0,04.

13. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,2 nM.

14. El anticuerpo anti–FcRH5 humanizado de acuerdo con la reivindicación 13 en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,2 nM +/– ,02.

15. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,5 nM.

16. El anticuerpo anti–FcRH5 humanizado de acuerdo con la reivindicación 15 en donde la afinidad del anticuerpo en su forma bivalente al FcRH5 humano es 0,5 nM +/– 0,1.

17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5–16 en donde la afinidad de unión se expresa como un valor de Kd.

18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5–16 en donde la afinidad de unión se mide por Biacore o radioinmunoensayo.

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende secuencia estructural de consenso del subgrupo 1 κ humano.

20. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende secuencia estructural de consenso de la cadena pesada del subgrupo III.

21. Un anticuerpo anti–FcRH5 humanizado en donde el anticuerpo humanizado cuando se conjuga a un agente citotóxico inhibe el crecimiento de células tumorales.

22. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico son monovalentes o bivalentes.

23. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo humanizado y el anticuerpo quimérico comprenden una región de Fab única ligada a una región Fc.

24. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de HVR1–HC, la HVR2–HC y/o HVR3–HC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 35–37).

25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el dominio variable comprende la secuencia de FR1–HC, FR2–HC, FR3–HC y/o FR4–HC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 31–34).

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en donde el anticuerpo comprende la secuencia de CH1 y/o Fc que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 38 y/o 39).

27. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de HVR1–LC, la HVR2–LC y/o HVR3–LC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 26–28).

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el dominio variable comprende la secuencia de FR1–LC, FR2–LC, FR3–LC y/o FR4–LC que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NOs: 22–25).

29. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en donde el anticuerpo comprende la secuencia de CL1 que se ilustra en la Figura 11 (SEQ ID NO: 29).

30. El polipéptido que comprende la secuencia que se ilustra en la Figura 10 (SEQ ID NO: 21).

31. El polipéptido que comprende la secuencia que se ilustra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 19).

32. El anticuerpo obtenido por el proceso de:

(a) cultivar una célula que expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24–26 y un dominio variable de la cadena liviana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27–29; y
(b) aislar el anticuerpo de dicha célula cultivada.

33. Un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24–26 y un dominio variable de la cadena liviana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27–29.

34. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el anticuerpo es monovalente y comprende una región de Fc.

35. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 19.

36. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 21.

37. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales seleccionadas de las SEQ ID NOs: 31, 32, 33 y 34.

38. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que

comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales seleccionadas de las SEQ ID NOs: 22, 23, 24 y 25.

39. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales que tienen al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un aminoácido seleccionado de las SEQ ID NOs: 31, 32, 33 y 34.

40. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que comprende uno, dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos estructurales que tienen al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos a un aminoácido seleccionado de las SEQ ID NOs: 22, 23, 24 y 25.

41. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 21.

42. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 19.

43. Un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

44. Un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

45. Un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

46. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165.

47. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 46.

48. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 47.

49. Un método de obtener un anticuerpo anti–FcRH5, en donde el método comprende (a) cultivar una célula huésped seleccionada del grupo que comprende una células eucariótica y una célula CHO en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y (b) aislar el anticuerpo.

50. Un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epitope que el epitope para un anticuerpo que comprende un polipéptido de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra

en la SEQ ID NO: 21; o una secuencia de consenso o variante sobre la base de dichas secuencias de aminoácidos.

51. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 50 que se une esencialmente al mismo epitope que el epitope para un anticuerpo que comprende un polipéptido de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 19; o a secuencia de consenso o variante sobre la base de dichas secuencias de aminoácidos.

52. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165, en donde el FcRH5 se expresa en la superficie de una célula.

53. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 52, en donde la célula es una célula B.

54. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 53, en donde la célula B se asocia con un trastorno proliferativo de las células B.

55. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 54, en donde el trastorno proliferativo de las células B es un cáncer.

56. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 55, en donde el trastorno proliferativo de las células B se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

57. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

58. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'–SH, Fv, scFv o $(Fab')_2$.

59. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el anticuerpo es humanizado.

60. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165, en donde el anticuerpo se une al mismo epitope que un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y un dominio variable de la cadena liviana de la SEQ ID NO:19.

61. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165 unido covalentemente a un agente citotóxico.

62. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el agente citotóxico se selecciona de una toxina, un agente quimioterapéutico, un residuo de fármaco, un antibiótico, un isótopo radiactivo y una enzima nucleolítica.

63. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 62, en donde el inmunoconjugado que tiene la fórmula Ab–(L–D)p, en donde: (a) Ab es el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41,164 o 165;
(b) L es un ligador;
(c) D es un residuo de fármaco.

64. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 63, en donde L se selecciona de 6–maleimidocaproílo (MC), maleimidopropanoílo (MP), valina–citrulina (val–cit), alanina–fenilalanina (ala–phe), p–aminobenciloxicarbonilo (PAB), N–Succinimidil 4–(2–piridiltio) pentanoate (SPP), 4–(N–maleimidometil) ciclohexano–1 carboxilato de N–succinimidilo (SMCC), éster del ácido 4–(2–Piridilditio)butíco de N–hidroxisuccinimida (SPDB), y (4–yodo–acetil) aminobenzoato de N–succinimidilo (SIAB).

65. El inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 63, en donde D se selecciona del grupo que consiste en un maytansinoide, una auristatina y dolostatina.

66. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 63 y un portador farmacéuticamente aceptable.

67. Un método de inhibir el crecimiento de una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165, causando de este modo la inhibición del crecimiento de dicha célula.

68. El método de acuerdo con la reivindicación 67 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

69. El método de acuerdo con la reivindicación 67 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

70. Un método de tratar un sujeto que tiene cáncer, dicho método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165.

71. El método de acuerdo con la reivindicación 70 en donde el cáncer se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

72. El método de acuerdo con la reivindicación 70 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

73. El método de acuerdo con la reivindicación 70 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

74. Un método de tratar un trastorno proliferativo en un sujeto, dicho método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 74 en donde dicho trastorno proliferativo es cáncer.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 75 en donde dicho cáncer se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 74 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 74 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

79. Un método de inhibir el crecimiento de una célula, en donde el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto con dicha célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165, de este modo se inhibe el crecimiento de dicha célula.

80. El método de acuerdo con la reivindicación 79 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

81. El método de acuerdo con la reivindicación 79 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

82. Un método de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de FcRH5, dicho método que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165.

83. El método de acuerdo con la reivindicación 82 en donde dicho tumor se asocia con linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico

pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

84. El método de acuerdo con la reivindicación 82 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

85. El método de acuerdo con la reivindicación 82 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

86. Un método de inhibir la proliferación de las células B que comprende exponer una célula a un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 64 en condiciones permisivas para la unión del inmunoconjugado a FcRH5.

87. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde la proliferación de las células B se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

88. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde la célula B es un xenoinjerto.

89. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde la exposición tiene lugar in vitro.

90. El método de acuerdo con la reivindicación 86, en donde la exposición tiene lugar in vivo.

91. Un método de determinar la presencia de FcRH5 en una muestra biológica de la que se sospecha que contiene FcRH5, dicho método que comprende exponer dicha muestra a un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165, y determinar la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra en donde la unión de dicho anticuerpo a FcRH5 en dicha muestra es indicativo de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

92. El método de acuerdo con la reivindicación 91 en donde la muestra biológica es de un paciente del que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo de las células B.

93. El método de acuerdo con la reivindicación 92 en donde el trastorno proliferativo de las células B se selecciona de linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

94. Un método de unión de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165 a una célula que expresa FcRH5, dicho método que comprende poner en contracto dicha célula con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165.

95. El método de acuerdo con la reivindicación 94 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico.

96. El método de acuerdo con la reivindicación 94 en donde dicho anticuerpo se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento.

97. Un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre, en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína se prepara por un proceso que comprende reemplazar uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo original por un aminoácido de cisteína libre, en donde el anticuerpo original es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165.

98. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 97 en donde uno o más aminoácidos de cisteína libre tiene un valor de reactividad del tio en el rango de 0,6 a 1,0.

99. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 97, en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína es más reactivo que el anticuerpo original con un agente reactivo con tio.

100. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 97 en donde el proceso además comprende determinar la reactividad tiol del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína por la reacción del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína con un agente reactivo con tiol;
en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína es más reactivo que el anticuerpo original con el agente reactivo con tiol.

101. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 97 en donde uno o más residuos de aminoácidos de cisteína libre se ubican en una cadena liviana.

102. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 97, en donde el anticuerpo es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína unido covalentemente a un agente citotóxico.

103. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 102, en donde el agente citotóxico se selecciona de una toxina, un agente quimioterapéutico, un residuo de fármaco, un antibiótico, un isótopo radiactivo, y una enzima nucleolítica.

104. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 97, en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca de captura, una marca de detección o un soporte sólido.

105. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 104 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca de captura de biotina.

106. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 104 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca de detección de colorante fluorescente.

107. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 106 en donde el colorante fluorescente se selecciona de un tipo fluoresceína, un tipo rodamina, dansilo, Lissamina, una cianina, una ficoeritrina, Texas Red, y un análogo de este.

108. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 104 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca de detección de radionucleido seleccionada

de ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, y ^{213}Bi.

109. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 104 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca de detección por una marca de detección por un ligando quelante.

110. El anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína de acuerdo con la reivindicación 109 en donde el ligando quelante se selecciona de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.

111. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165 que comprende un péptido de unión a albúmina.

112. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 111, en donde el péptido de unión al aluminio se selecciona de las SEQ ID NOs: 246–250.

113. Un anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína que comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre en una o más posiciones de la cadena liviana de acuerdo con la convención de numeración de Kabat y en una o más posiciones de la cadena pesada de acuerdo con la convención de numeración de Kabat y en una o más posiciones de la cadena pesada de acuerdo con la convención de numeración EU de un anticuerpo original, en donde el anticuerpo original es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 33, 41, 164 o 165.

114. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, y un anticuerpo humanizado.

115. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 que es un fragmento de anticuerpo.

116. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 115 en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

117. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 que se selecciona de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, o un anticuerpo humanizado.

118. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 que se produce en las bacterias.

119. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 que se produce en las células CHO.

120. Un método de determinar la presencia de una proteína de FcRH5 en una muestra en la que se sospecha que contiene dicha proteína, dicho método que comprende exponer dicha muestra a un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 109 y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha proteína de FcRH5 en dicha muestra, en donde la unión del anticuerpo a dicha proteína es indicativa de la presencia de dicha proteína en dicha muestra.

121. El método de acuerdo con la reivindicación 120 en donde dicha muestra comprende una célula que se sospecha que expresa dicha proteína de FcRH5.

122. El método de acuerdo con la reivindicación 120 en donde dicha célula es una célula B.

123. El método de acuerdo con la reivindicación 120 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a una marca seleccionada de un colorante fluorescente, un radioisótopo, biotina, o un ligando que compleja metal.

124. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti–FcRH5 de acuerdo con la reivindicación 113, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

125. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo está unido covalentemente a un residuo de fármaco auristatina o maytansinoide por el cual se forma un conjugado de anticuerpo y fármaco.

126. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125 que comprende un anticuerpo (Ab), y un residuo de fármaco auristatina o maytansinoide (D) en donde el anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína está unido a través de uno o más aminoácidos de cisteína libre con un residuo ligador (L) a D; el compuesto que tiene la Fórmula I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

donde p es 1, 2, 3, o 4.

127. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde p es 2.

128. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde L tiene la fórmula:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

donde:

A es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de la cisteína del anticuerpo manipulado genéticamente en cisteína (Ab);

a es 0 o 1;

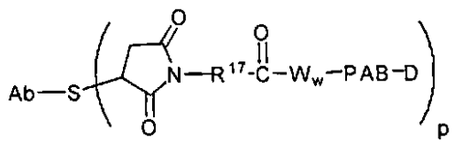
cada W es de modo independiente una unidad de aminoácido;

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

Y es una unidad espaciadora unida covalentemente al residuo del fármaco; y

y es 0, 1 o 2.

129. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 128 que tiene la fórmula:

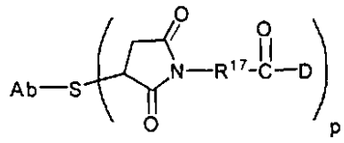


donde PAB es para–aminobencilcarbamoílo, y R^{17} es un radical divalente seleccionado de $(CH_2)_r$, carbociclilo C_3–C_8, O–$(CH_2)_r$, arileno, $(CH_2)_r$–arileno, –arileno–$(CH_2)_r$–, $(CH_2)_r$–(carbociclilo C_3–C_8), (carbociclil C_3–C_8)–$(CH_2)_r$, heterociclilo C_3–C_8, $(CH_2)_r$–(heterociclilo C_3–C_8, –(heterociclilo C_3–C_8–$(CH_2)_r$–, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, y $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$; donde R^b es H, alquilo C_1–C6, fenilo, o bencilo; y r es de modo independiente un número entero que varía de 1 a 10.

130. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 128 en donde W_w es valina–citrulina.

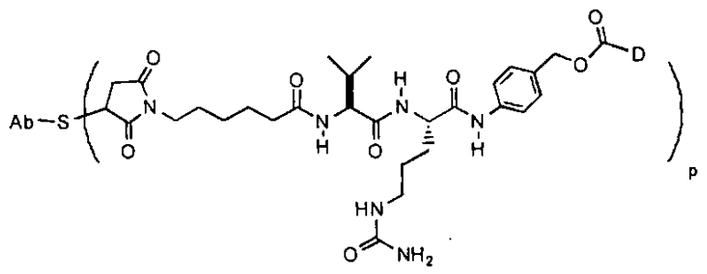
131. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 128 en donde R^{17} es $(CH_2)_5$ o $(CH_2)_2$.

132. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 128 que tiene la fórmula:



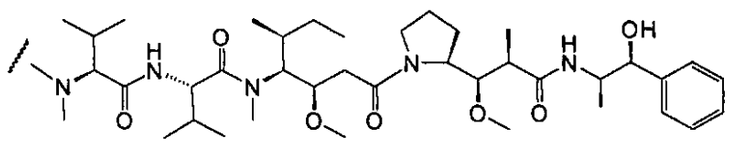
133. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 132 en donde R^{17} es $(CH_2)_5$ o $(CH_2)_2$.

134. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 128 que tiene la fórmula:



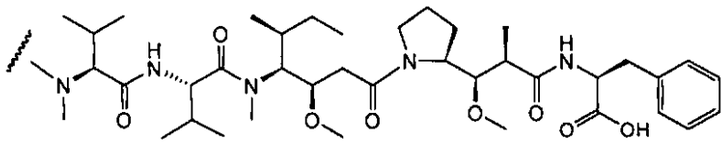
135. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde L es SMCC, SPP, SPDB o BMPEO.

136. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde D es MMAE, que tiene la estructura:



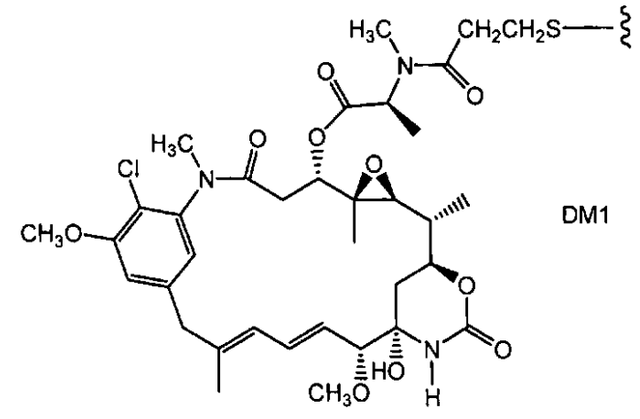
en donde la línea ondulada indica el sitio de unión al ligador L.

137. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde D es MMAF, que tiene la estructura:

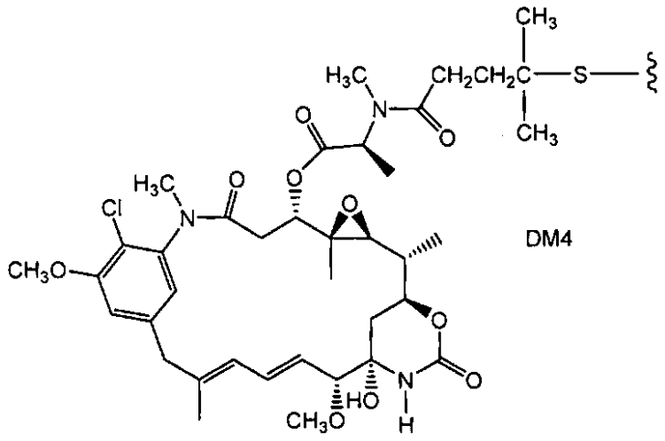


en donde la línea ondulada indica el sitio de unión al ligador L.

138. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde D es DM1 o DM4, que tiene las estructuras:



DM1



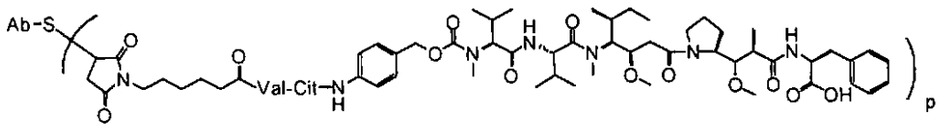
DM4

en donde la línea ondulada indica el sitio de unión al ligador L.

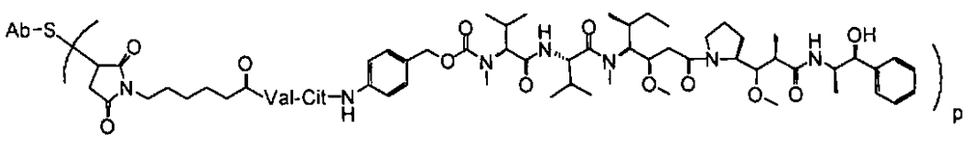
139. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125 en donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, y un fragmento de anticuerpo.

140. El compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125 en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

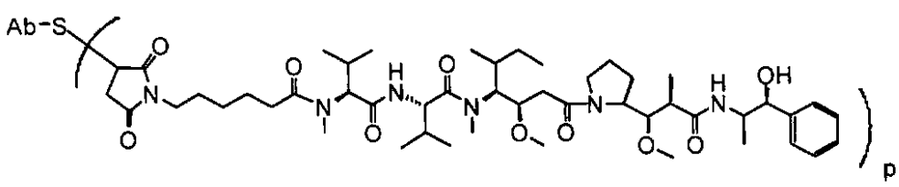
141. Un compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco seleccionado de las estructuras:



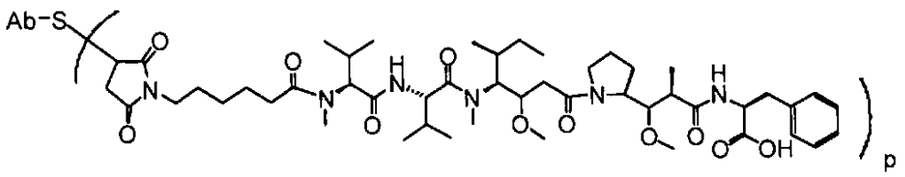
Ab–MC–vc–PAB–MMAF



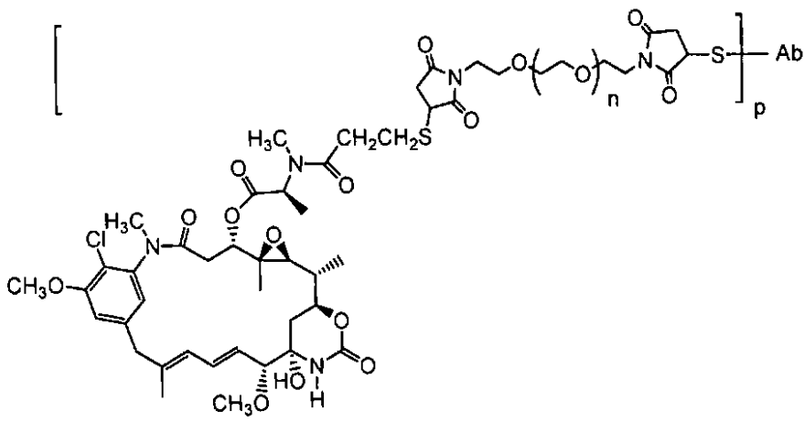
Ab–MC–vc–PAB–MMAE



Ab–MC–MMAE



Ab–MC–MMAF



Ab–BMPEO–DM1

en donde Val es valina; Cit es citrulina; p es 1, 2, 3, o 4; y Ab es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113.

142. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125 en donde la auristatina es MMAE o MMAF.

143. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 126 en donde L es MC–val–cit–PAB o MC.

144. Un ensayo para detectar células B que comprende:

(a) exponer las células a un compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 124; y

(b) determinar el grado de unión del compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco a las células.

145. Un método de inhibir la proliferación celular que comprende tratar las células B cancerosas de mamífero en un medio de cultivo con un compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125, mediante el cual se inhibe la proliferación de las células B cancerosas.

146. Una formulación farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 125, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

147. Un método de tratar cáncer que comprende administrar a un paciente la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 146.

148. El método de acuerdo con la reivindicación 147 en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

149. El método de acuerdo con la reivindicación 147 en donde se administra al paciente un agente citotóxico en combinación con el compuesto de conjugado de anticuerpo y fármaco.

150. Un artículo de manufactura que comprende

la formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 146;

un recipiente; y

un prospecto o rótulo que indica que el compuesto se puede usar para tratar cáncer caracterizado por la sobreexpresión del polipéptido de FcRH5.

151. El artículo de manufactura de acuerdo con la reivindicación 150 en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recidivante, NHL indolente recidivante, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), y linfoma de células del manto.

152. Un método de obtener un compuesto del conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende un anticuerpo anti–FcRH5 (Ab) de acuerdo con la reivindicación 113, y un residuo de fármaco auristatina o maytansinoide (D) en donde el anticuerpo se une mediante uno o más aminoácidos de cisteína manipulados genéticamente por residuo ligador (L) a D; el compuesto que tiene la Fórmula I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

donde p es 1, 2, 3, o 4; el método que comprende las etapas de:

(a) reacción de un grupo de cisteína manipulado genéticamente del anticuerpo con un reactivo ligador para formar un intermediario anticuerpo-ligador Ab–L; y

(b) reacción de Ab–L con un residuo de fármaco activado D; mediante el cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco;

o que comprende las etapas de:

(c) reacción de un grupo nucleofílico de un residuo de fármaco con un reactivo ligador para formar el intermediario fármaco-ligador D–L; y

(d) reacción de D–L con un grupo de cisteína manipulado genéticamente del anticuerpo; mediante el cual se forma el conjugado de anticuerpo y fármaco.

153. El método de acuerdo con la reivindicación 152 que además comprende la etapa de expresar el anticuerpo en células de ovario de hámster chino (CHO).

154. El método de acuerdo con la reivindicación 152 que además comprende la etapa de tratar el anticuerpo expresado con un agente reductor.

155. El método de acuerdo con la reivindicación 154 en donde el agente reductor se selecciona de TCEP y DTT.

156. El método de acuerdo con la reivindicación 154 que además comprende la etapa de tratar el anticuerpo expresado con un agente oxidante, después de tratar con el agente reductor.

157. El método de acuerdo con la reivindicación 156 en donde el agente oxidante se selecciona de sulfato de cobre, ácido dehidroascórbico, y aire.

158. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de alguna de la SEQ ID NO: 42.

159. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y a secuencia de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

160. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquier SEQ ID NOs: 44.

161. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113 en donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43 y una secuencia de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44.

162. Una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 33, 41, 164 o 165.

163. La composición de acuerdo con la reivindicación 162, en donde la composición comprende un vehículo.

164. Un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 20 y un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 18.

165. Un anticuerpo que se une al FcRH5, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 13 y un dominio variable de la cadena liviana que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 11.

166. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113, en donde una cisteína está en la posición 205 de la cadena liviana.

167. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113, en donde una cisteína está en la posición 114 de la cadena pesada.

168. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 113, en donde una cisteína está en la posición 400 de la cadena pesada.

169. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 53, en donde la célula B se asocia con un trastorno de las células plasmáticas.

170. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 169, en donde el trastorno de las células plasmáticas es un cáncer.

171. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 170, en donde el trastorno de las células plasmáticas se selecciona de gamopatías monoclonales de significación indeterminado (MGUS), mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia, enfermedad de la cadena pesada, amiloidosis de cadena liviana sistémica (AL), plasmocitoma solitario, plasmocitoma extramedular, plasmocitomas solitarios múltiples, leucemia de células plasmáticas, Linfomas no Hodgkin, no células B, leucemia linfocítica crónica de células B.

172. El método de acuerdo con la reivindicación 67, que además comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

173. El método de acuerdo con la reivindicación 70, que además comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

174. El método de acuerdo con la reivindicación 74, que además comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

175. El método de acuerdo con la reivindicación 79, que además comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

176. El método de acuerdo con la reivindicación 82, que además comprende poner en contacto dicha células con una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

177. El método de acuerdo con la reivindicación 86, que además comprende exponer dicha célula a una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

178. El método de acuerdo con la reivindicación 147 que además comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de otro agente terapéutico.

179. El método de acuerdo con la reivindicación 172, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

180. El método de acuerdo con la reivindicación 179, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifenoo, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecanoo,

cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatinoo, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

181. El método de acuerdo con la reivindicación 173, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

182. El método de acuerdo con la reivindicación 181, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

183. El método de acuerdo con la reivindicación 174, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

184. El método de acuerdo con la reivindicación 183, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

185. El método de acuerdo con la reivindicación 175, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

186. El método de acuerdo con la reivindicación 185, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

187. El método de acuerdo con la reivindicación 176, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un

antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

188. El método de acuerdo con la reivindicación 187, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

189. El método de acuerdo con la reivindicación 177, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

190. El método de acuerdo con la reivindicación 189, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

191. El método de acuerdo con la reivindicación 178, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en un

anticuerpo, un agente quimioterapéutico, a agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticoide, un antiemético, una vacuna del cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento.

192. El método de acuerdo con la reivindicación 191, en donde el agente terapéutico se seleccionada del grupo que consiste en velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, pemetrexed, 5–fluorouracilo, doxorrubicina, bortezomib, lenalidomida, melfalina, prednisona, dexametasona, o docetaxel.

193. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

194. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 193 que se une específicamente a CD3.

195. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 194 que es un anticuerpo protuberancia dentro de la cavidad.

196. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 195 que está aglicosilado.

197. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 196 que se produce en una célula huésped de *Escherichia coli.*

198. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 196 que carece de una o más funciones efectoras de Fc.

199. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 198 que carece de actividad ADCC.

Figura 1

Cadena liviana de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (ADN)

CACTCCCAGCTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTC
TAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCCTGCTGACACAATCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAG
GAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGTCCAGTCAGAGCATTGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACAA
ATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTTTGCTTCTGAGTCTCTCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAATAGTGTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGATTACTACTGTCAACAAA
GTAATAGCTGGCCACTCACGTTCGGTGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT**TAA**G
CTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGA
TCGGGAATTAATTCGGC (SEQ ID NO:10)

Figura 2

Cadena liviana de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (Aminoácido)

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSI
NSVESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
ADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:11)

Figura 3

Cadena pesada de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (ADN)

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGC
GTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGT
CGCAACCATTACTAGAAATGGTGGTACCACCTATTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA
CAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAG
AGGTCCTATCTACTATGATTACGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACAGTCACAGTCTCCTCAGC
CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTT
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA
ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT (SEQ ID NO:12)

Figura 4

Cadena pesada de FcRH5 7D11 anti-humano quimérico (Aminoácido)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATITRNGGTTYYLDSVKGRFTISRADN
KNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARGPIYYDYGYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:13)

572

Figura 5

Cadena liviana de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico

ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC
TGGAGTACATTCAGATATCGTGATGACCCAGTCTCATAAATTCATGTCCACATCAGTAAGAGACAGGGTCAG
CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCC
TAAACTACTGATTTATTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGG
GACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTT
TAGTAGTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGT**TAA**GCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
CATCACAA (SEQ ID NO:14)

Figura 6

Cadena liviana de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico

DIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFT
FTISSVQAEDLAVYYCQQHFSSPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:15)

Figura 7

Cadena pesada de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico

CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCA
ACTGGAGCGTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA
AATCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCGTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGA
AGAGGCTGGAGTGGGTCGCTACCATTAGCAGTGGTGGTAGTTTGACCTTCTATTTAGACAGTGTGAGGGGT
CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGA
CACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCCCATTCCGGATTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
AGCACCTGAACCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGG
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTT
TATTGCAG (SEQ ID NO:16)

Figura 8

Cadena pesada de FcRH5 (mAb10A8) anti-humano quimérico

EVQLVESGGGLVKPGGSLKISCAASGFTFSSYAVSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSLTFYLDSVRGRFTIS
RADNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARPIPDYYALDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

Figura 9

Cadenas livianas
10A8 murino = SEQ ID NO: 18
10A8v1 humanizado= SEQ ID NO: 19

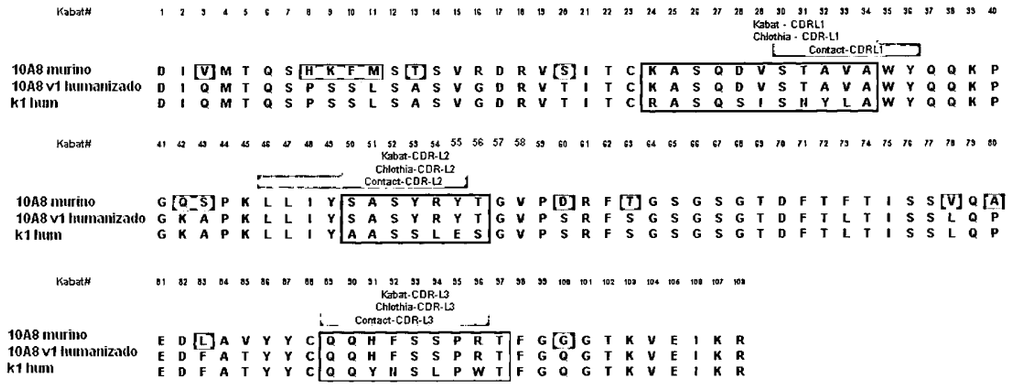


Figura 10 Cadenas pesadas (10A8 murino= SEQ ID NO: 20; hu 10A8 v1 = SEQ ID NO: 21)

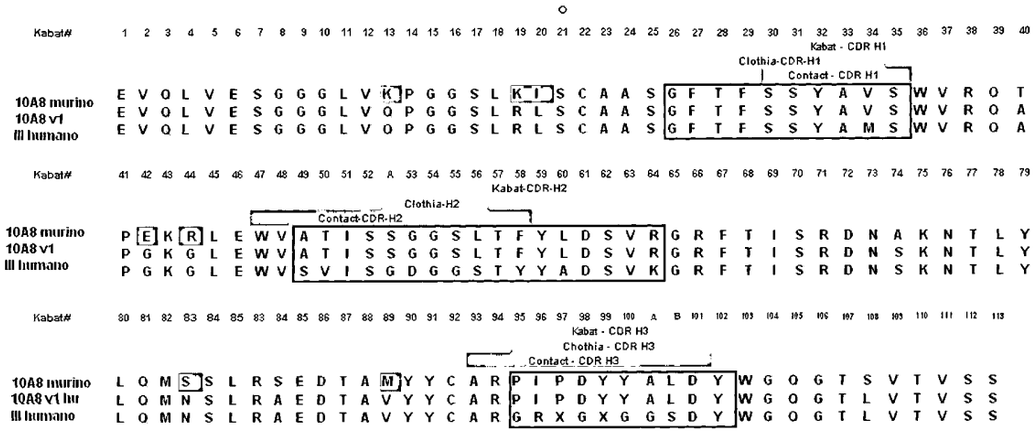


Figura 11

Cadena liviana Hu10A8

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:22)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:23)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:24)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:25)
HVR1-LC: KASQDVSTAVA (SEQ ID NO:26)
HVR2-LC: SASYRYT (SEQ ID NO:27)
HVR3-LC: QQHFSSPRT (SEQ ID NO:28)

CL: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

LC-Dominio variable:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:30)

Cadena pesada Hu10A8

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:32)
FR3-HC: RGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34)
HVR1-HC: AASGFTFSSYAVS (SEQ ID NO:35)
HVR2-HC: ATISSGGSLTFYLDSV (SEQ ID NO:36)
HVR3-H3: ARPIPDYYALDY (SEQ ID NO:37)

CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)

Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39)

HC-dominio variable:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
LDSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)

Figura 12

Tio-Mab de cadena pesada manipulada genéticamente en cisteína Anti-FcRH5 A118C huMA10A8

A. secuencia de la cadena liviana
Tio-huMA10A8-HC-A118C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

B. secuencia de la cadena pesada
Tio-huMab10A8-HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFYLDSVRGRFTISRDNSKNT
LY
LQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*CPPCPAPELLG*
GP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

Figura 13

Tio-Mab de cadena liviana manipulada genéticamente en cisteína Anti-FcRH5 V205C huMA10A8b

A. Secuencia de la cadena liviana
Tio-huMAb10A8-LC-V205C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

B. Secuencia de la cadena pesada
Tio-huMA10A8-LC-V205C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY
LDSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYYALDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*CPPCPAPELLGGP*
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

Figura 14 **Reactividad cruzada de anticuerpos FcRH5 100205 FcRH**

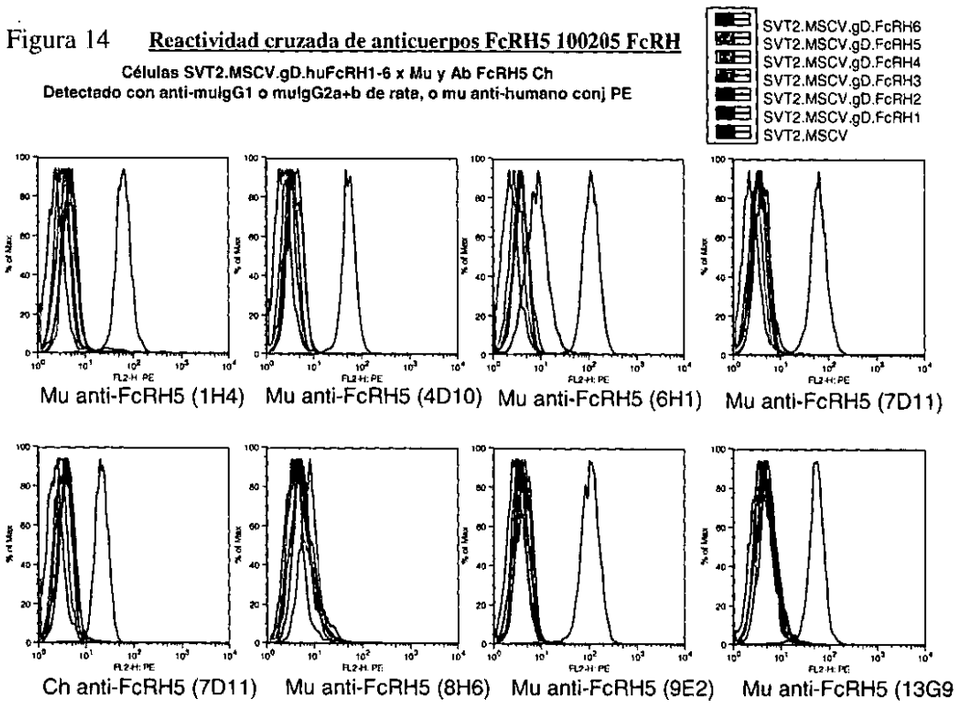


figura 15**Reactividad cruzada de anticuerpos FcRH5 112105 FcRH**

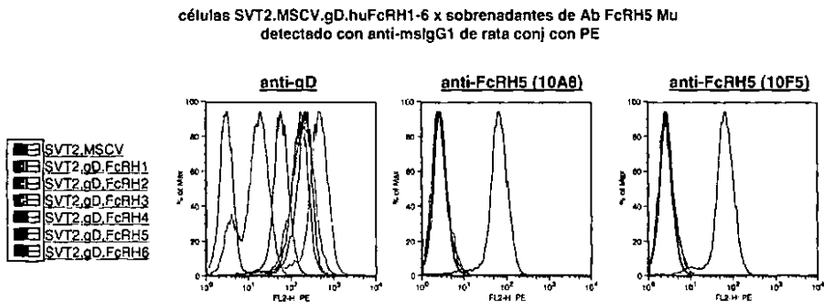
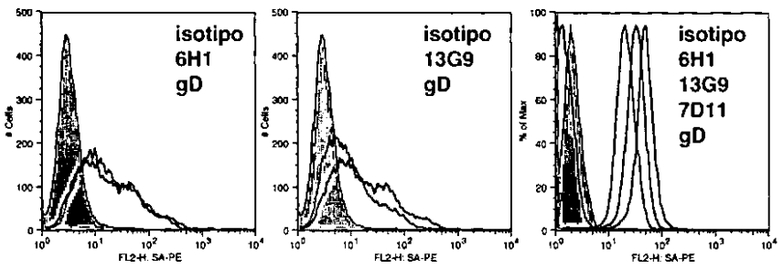


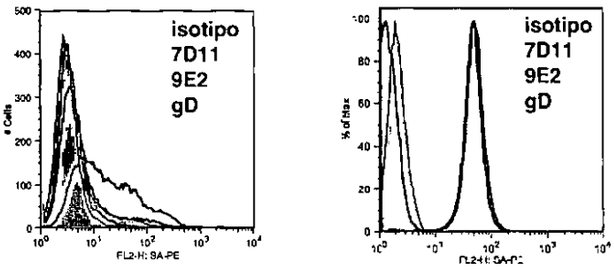
Figura 16

6H1 murino y 13GP reacciona cruzado con FcRH5 de cyno



293T/gD.cynoFcRH5 Raji/huFcRH5

figura 17



293T/gD.cynoFcRH5 Raji/huFcRH5

Figura 18

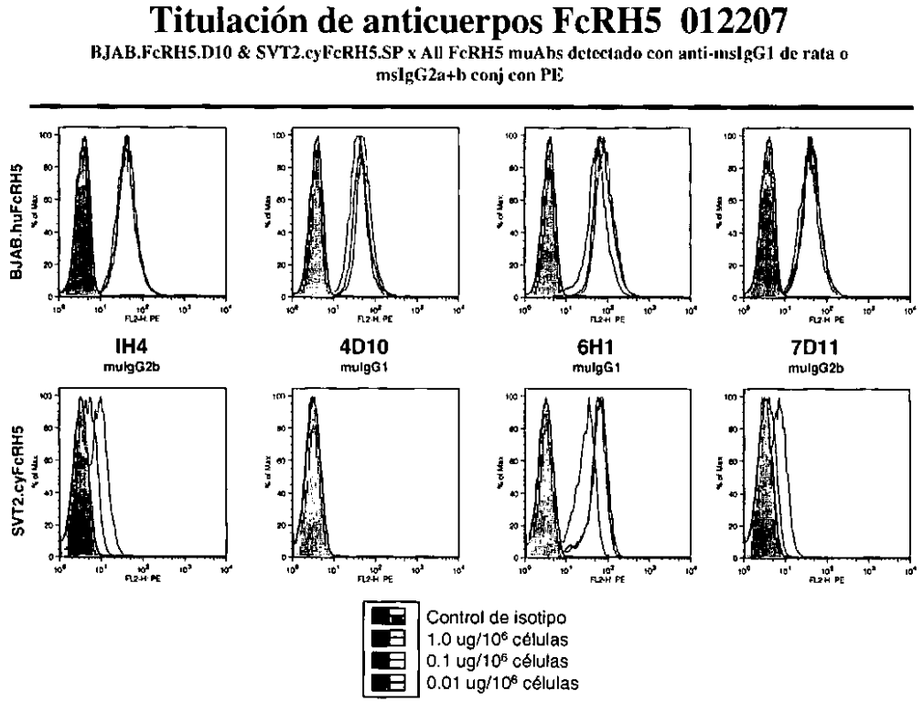


Figura 19

Titulación de anticuerpos FcRH5 012207

BJAB.FcRH5.D10 & SVT2.cyFcRH5.SP x All FcRH5 muAbs detectado con anti-msIgG1 de rata o msIgG2a+b conj con PE

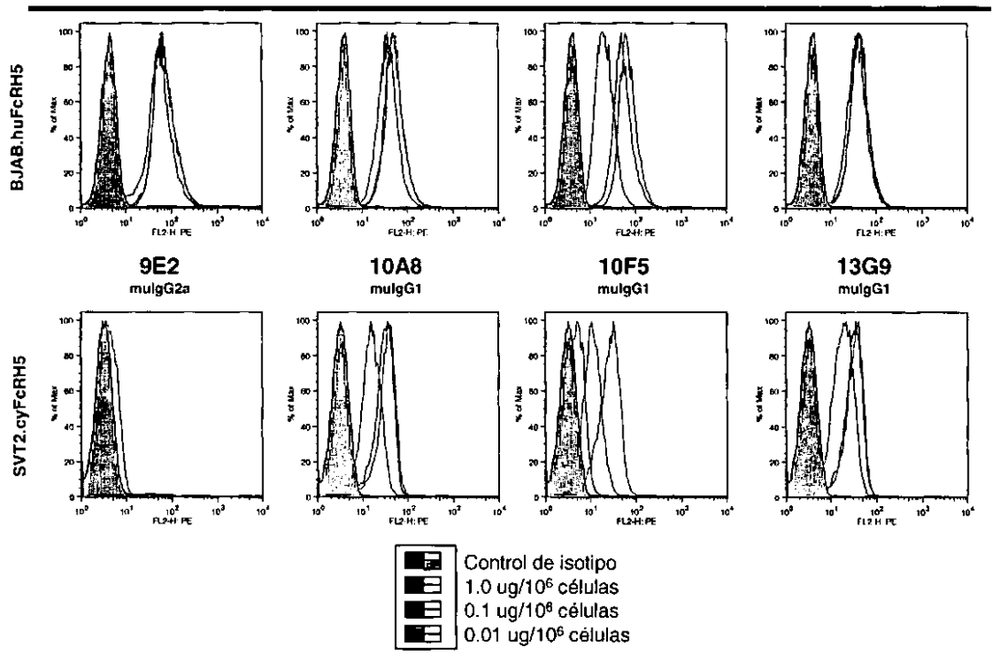
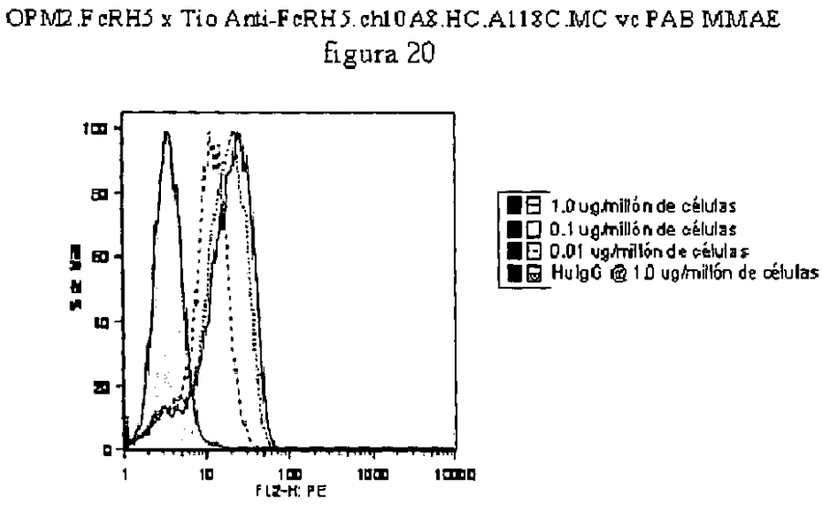


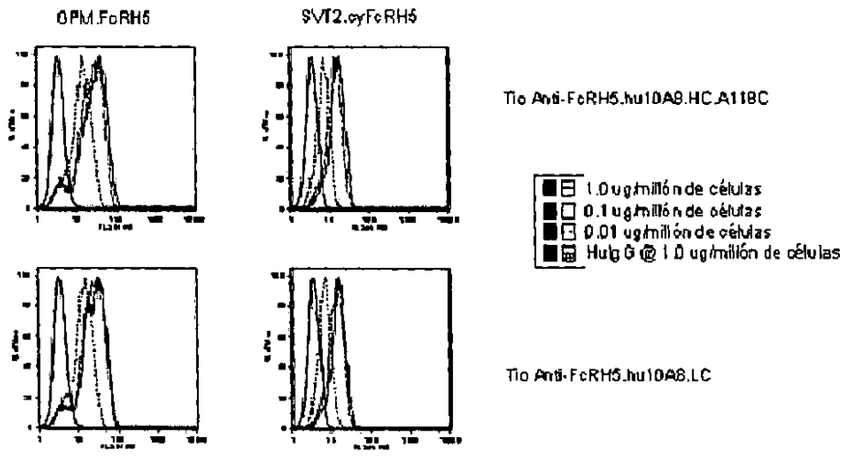
Figura 20



La Figura 20 es un gráfico de FACS que indica que la unión del conjugado de Tio Anti-FcRH5 ch 10A8.HC.A118.MC vc PAB y fármaco MMAE (ADC) de la invención unido a FcRH5 expresado sobre la superficie de las células OPM2 transfectadas con FcRH5 humano. La detección fue con IgG1 anti-ratón de rata-PE

Figura 21

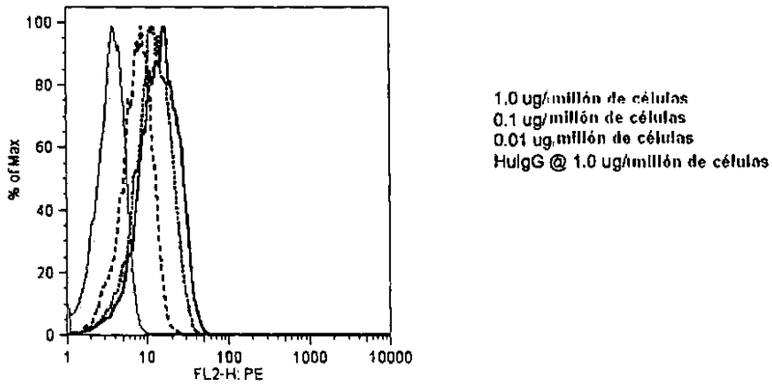
OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Tio Anti-FcRH5.hu10A8.HC.A118C
OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Tio Anti-FcRH5.hu10A8.LC.V205C
figura 21



La Figura 21 son gráficos de FACS que indican la unión titulada de anti-FcRH5 10A8.HC.A118 tio humanizado desnudo y anti-FcRH5 10A8.LC.V205C tio humanizado a las células OPM2 transfectadas con huFcRH5 y las células SVT2 transfectadas con FcRH5 de cyno

Figura 22

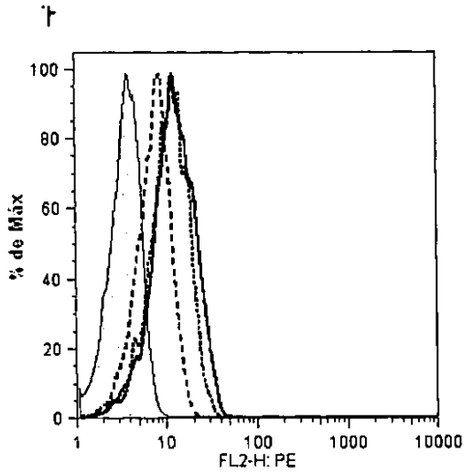
OPM2.FcRH5 x Tio Hu Anti-FcRH5.10A8.HC.A118C.MC vc PAB MMAE



La Figura 22 es un gráfico de FACS que indica la unión del conjugado (ADC)de anti-FcRH5.10A8.HC.A118.MC tio hu vc fármaco PAB MMAE de la invención unido a FcRH5 expresado sobre la superficie de las células OPM2 transfectadas con FcRH5 humano. La detección fue con IgG-PE anti-humano de rata

Figura 23

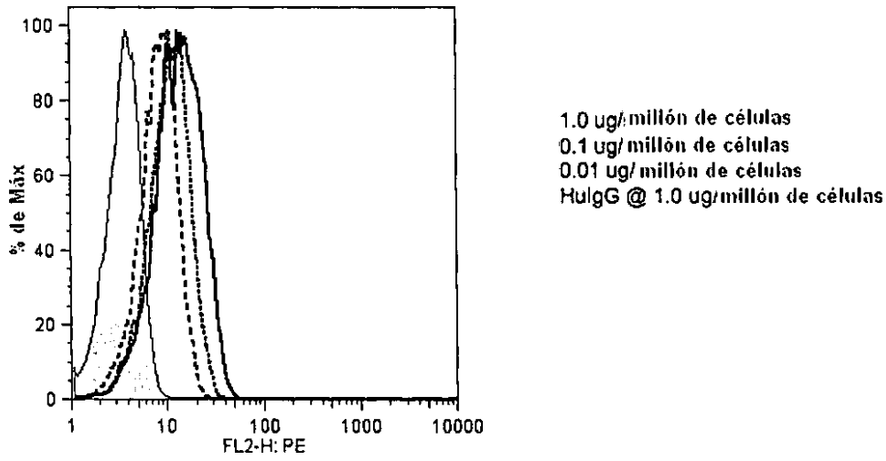
OPM2.FcRH5 x Tio Hu Anti-FcRH5.10A8.LC.V205C.MC vc PAB MMAE



La Figura 23 es un gráfico de FACS que indica la unión del conjugado (ADC) de anti-FcRH5.10A8.HC.V205C.MC tio hu vc fármaco PAB MMA de la invención unido a FcRH5 expresado sobre la superficie de las células OPM2 transfectadas con FcRH5 humano. La detección fue con IgG-PE anti-humano de rata

Figura 24

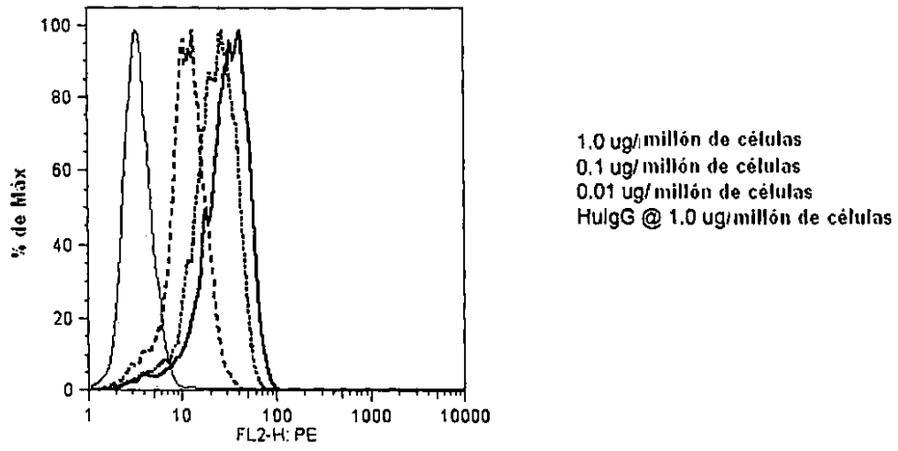
OPM2.FcRH5 x Ch Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4



La Figura 24 es un gráfico de FACS que indica la unión del conjugado (ADC)de anti-FcRH5.10A8 Ch fármaco SPDB.DM4 de la invención unido a FcRH5 expresado sobre la superficie de las células OPM2 transfectadas con FcRH5 humano. La detección fue con IgG-PE anti-humano de rata

Figura 25

OPM2.FcRH5 x Hu Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4



La Figura 25 es un gráfico de FACS que indica la unión del conjugado (ADC) de anti-FcRH5.10A8 Hu y fármaco SPDB.DM4 de la invención unido a FcRH5 expresado sobre la superficie de las células OPM2 transfectadas con FcRH5 humano. La detección fue con IgG-PE anti-humano de rata

Figura 26

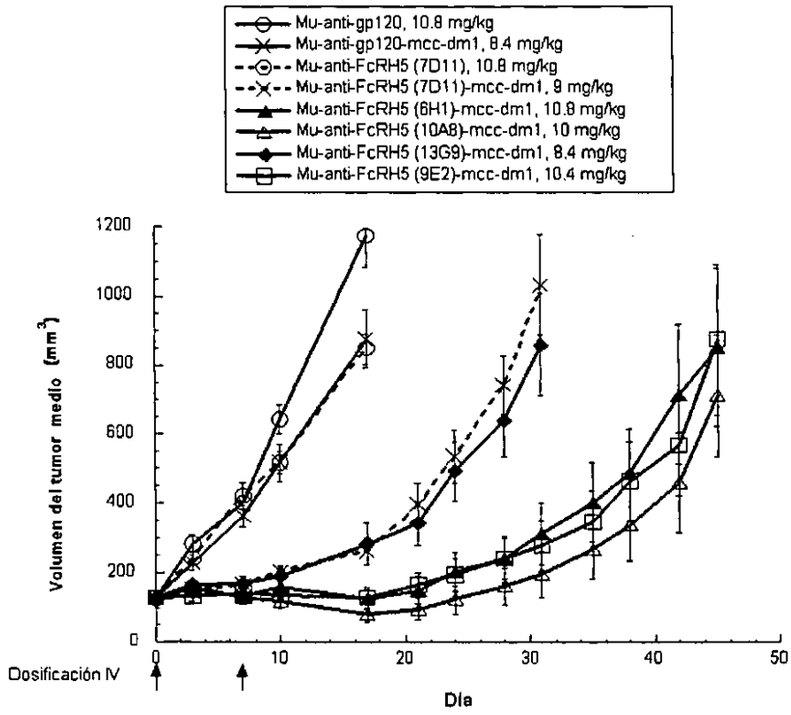

Mu-anti-gp120, 10.8 mg/kg
Mu-anti-gp120-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (7D11), 10.8 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (7D11)-mcc-dm1, 9 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (6H1)-mcc-dm1, 10.8 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (10A8)-mcc-dm1, 10 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (13G9)-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (9E2)-mcc-dm1, 10.4 mg/kg
Volumen del tumor medio (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Dosificación IV
Día

Figura 27

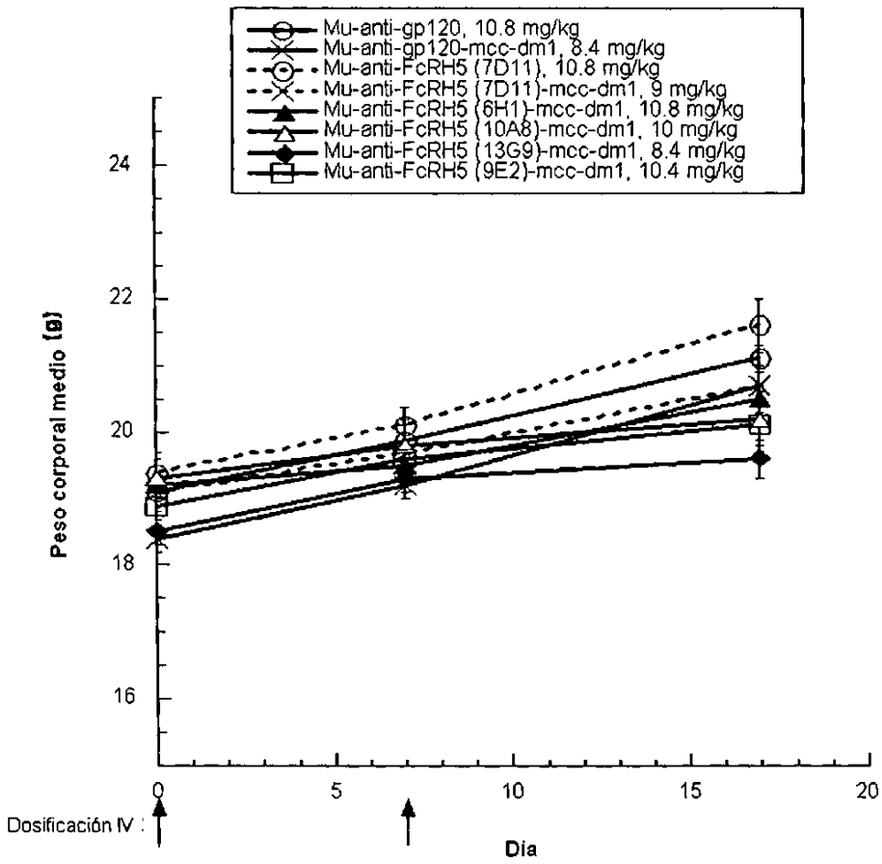

Mu-anti-gp120, 10.8 mg/kg
Mu-anti-gp120-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (7D11), 10.8 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (7D11)-mcc-dm1, 9 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (6H1)-mcc-dm1, 10.8 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (10A8)-mcc-dm1, 10 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (13G9)-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-anti-FcRH5 (9E2)-mcc-dm1, 10.4 mg/kg
Peso corporal medio (g)
24
22
20
18
16
0
5
10
15
20
Dosificación IV :
Dia

Figura 28

Tio-HC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, tio-LC-anti-FcRH5 (10A8) -MCvcPAB-MMAE, y anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 vs. un xenoinjerto de OPM2-FcRh5 de mieloma múltiple en ratones Scid CB17
Protocolo 08-1184

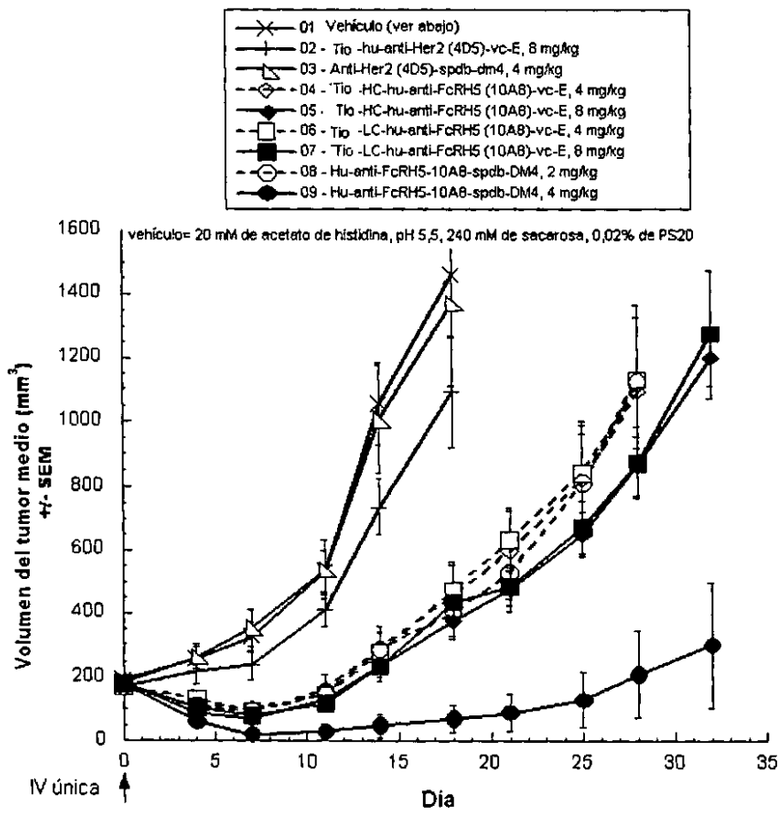


Figura 29

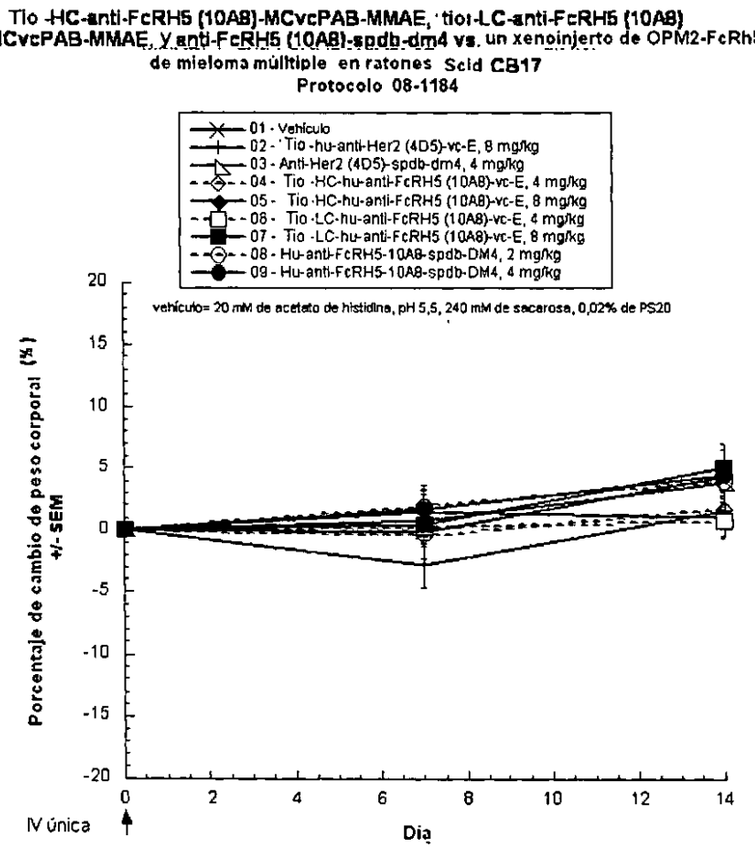

Tio -HC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, tio-LC-anti-FcRH5 (10A8) -MCvcPAB-MMAE, y anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 vs. un xenoinjerto de OPM2-FcRh5 de mieloma múltiple en ratones Scid CB17
Protocolo 08-1184
01 - Vehículo
02 - Tio -hu-anti-Her2 (4D5)-vc-E, 8 mg/kg
03 - Anti-Her2 (4D5)-spdb-dm4, 4 mg/kg
04 - Tio -HC-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E, 4 mg/kg
05 - Tio -HC-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E, 8 mg/kg
06 - Tio -LC-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E, 4 mg/kg
07 - Tio -LC-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E, 8 mg/kg
08 - Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4, 2 mg/kg
09 - Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4, 4 mg/kg
vehículo= 20 mM de acetato de histidina, pH 5,5, 240 mM de sacarosa, 0,02% de PS20
Porcentaje de cambio de peso corporal (%) +/- SEM
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
2
4
6
8
10
12
14
IV única
Día

Figura 30a

Modelo de anti-FcRH5-SPDB-DM4 en OPM-2-FcRH5

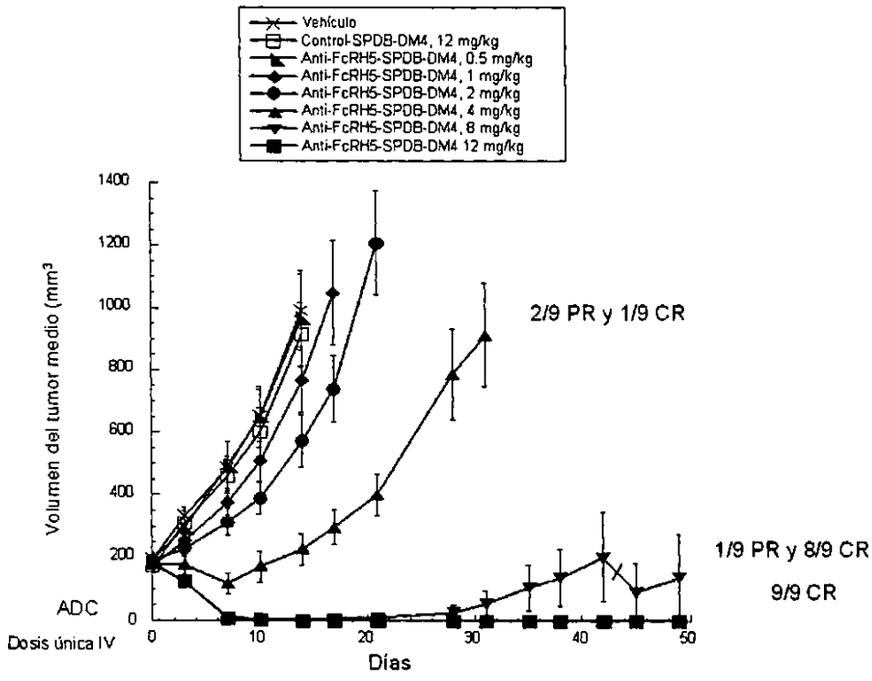


Figura 30b

Modelo de Anti-FcRH5-SPDB-DM4 en OPM-2-FcRH5

Estudio de rango de dosis de anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 vs. xenoinjerto de OPM2-FcRH5 de mieloma múltiple en ratones Scid CB17

Protocolo # 08.1184D

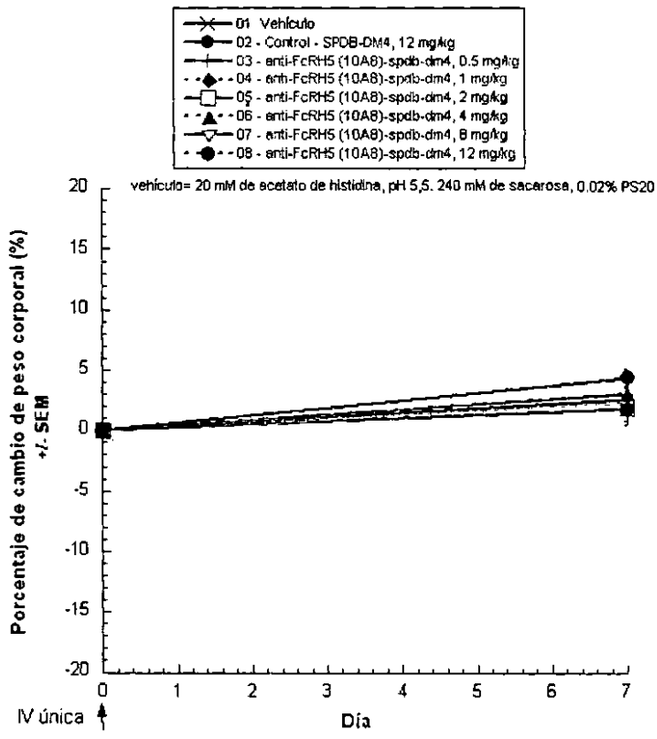


Figura 31

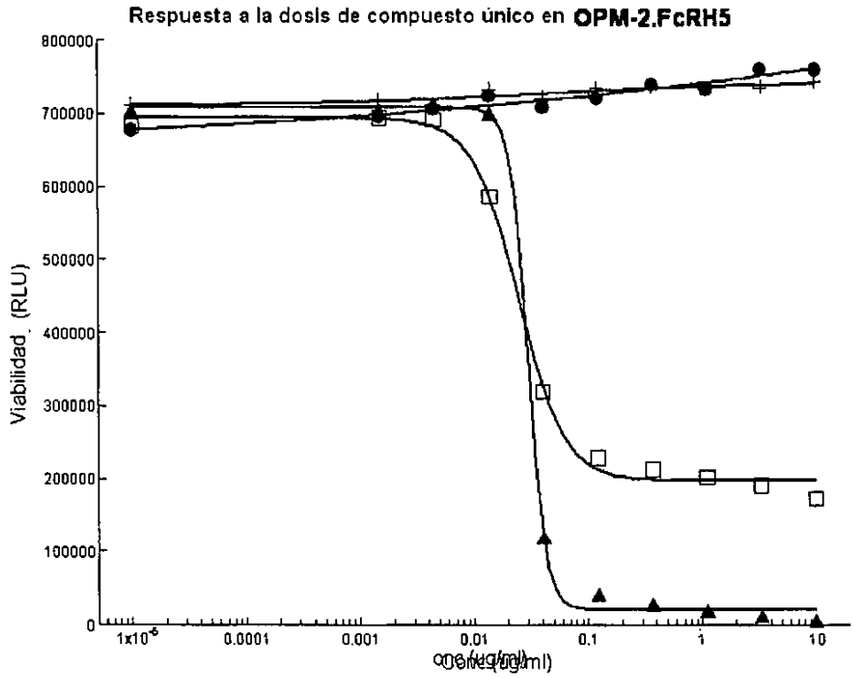

Respuesta a la dosis de compuesto único en OPM-2.FcRH5
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Viabilidad (RLU)
1x10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Conc. (µg/ml)

Figura 32

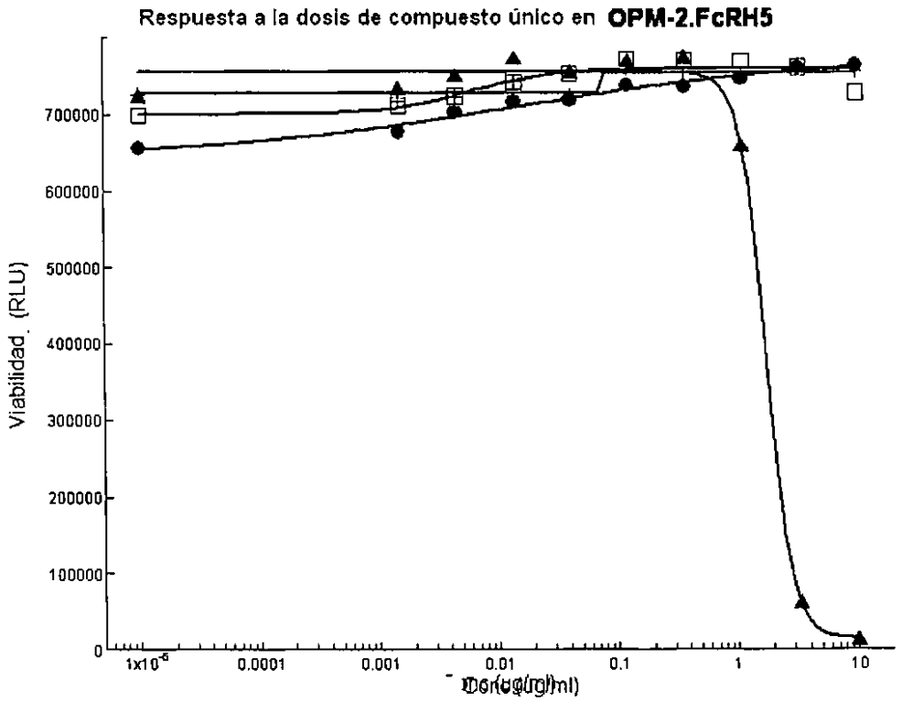

Respuesta a la dosis de compuesto único en OPM-2.FcRH5
Viabilidad. (RLU)
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1x10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Dosis (ug/ml)

Figura 33

GATGTGCTCCTTGGAGCTGGTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCT
GTTTTGGAATTGAGGAAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCA
TGCTCTGTGGGTGATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGAC
ACCCAGGCCCATTATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAG
AGTGACCCTCACTTGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCACCACAGAAAACAAAATGGTA
CCATCGGTACCTTGGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCCAGACAATATCCTTGAGGT
TCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGT
GCACTTGGATTTTTCTTCAGAGATGGGATTTCCTCATGCTGCCCAGGCTAATGTTGAA
CTCCTGGGCTCAAGTGATCTGCTCACCTAGGCCTCTCAAAGCGCTGGGATTACAGCT
TCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGT
GCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAATGATAATGTC
CTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 34

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSEMGFPHAAQANVELLGSS
DLLT

Figura 35 A

AATTCACTAATGCATTCTGCTCTTTTTGAGAGCACAGCTTCTCAGATGTGCTCCTTGG
AGCTGGTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTTGGAATTGAG
GAAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTC**ATG**CTGCTGTGGGTG
ATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATT
ATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCCTCACT
TGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCACCACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTC
GGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCCAGACAATATCCTTGAGGTTCAGGAATCTGG
AGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGCACTTGGATTT
TTCTTCAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTG
GTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAAT
GATAATGTCCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCATATTCCTCATGCATGTC
TCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAAGTTGTTGCCCTGTTT
CTTCCAATACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGCCATTTACACGTCCAGTGCTGAGAG
CCAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAACCCAGTGACCCTGACCTGTGAGACCCAGC
TCTCTCTAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCGGTTCCGCTTCTTCAGAGATGACCAGAC
CCTGGGATTAGGCTGGAGTCTCTCCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAA
AGATTCAGGGTTCTACTGGTGTAAGGCAGCAACAATGCCTCACAGCGTCATATCTGA
CAGCCCGAGATCCTGGATACAGGTGCAGATCCCTGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTC
AGCCCTGAAAAGGCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACC
CAGGAAGATTCTCTGCGCACTTTGTACAGGTTTTATCATGAGGGTGTCCCCCTGAGGC
ACAAGTCAGTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCCATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGA
ATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCTTGGCGCCAAGCCCAGTAAGG
CTGTGAGCCTCTCAGTCACTGTTCCCGTGTCTCATCCTGTCCTCAACCTCAGCTCTCCT
GAGGACCTGATTTTTGAGGGAGCCAAGGTGACACTTCACTGTGAAGCCCAGAGAGGT
TCACTCCCCATCCTGTACCAGTTTCATCATGAGGATGCTGCCCTGGAGCGTAGGTCGG
CCAACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGAGCATTCAGGGA
ACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTAAGGCGGTGAGCC
TCTCCATCACTGTCCCTGTGTCTCATCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTG
ACTTTTGAAGGAGCCACTGTGACACTTCACTGTGAAGTCCAGAGAGGTTCCCCACAA
ATCCTATACCAGTTTTATCATGAGGACATGCCCCTGTGGAGCAGCTCAACACCCTCTG
TGGGAAGAGTGTCCTTCAGCTTCTCTCTGACTGAAGGACATTCAGGGAATTACTACT
GCACAGCTGACAATGGCTTTGGTCCCCAGCGCAGTGAAGTGGTGAGCCTTTTTGTCA
CTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTCACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGT
GGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCCGAGAGGCTCTCCCCCAATCCTGTA
CTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGCAGCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGA
AGCTTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAAACTACTCATGTGAGGCC
AACAATGGCCTAGTGGCCCAGCACAGTGACACAATATCACTCAGTGTTATAGTTCCA
GTATCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGGGCTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGAC
CTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTT
ATCATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCCTCCT
TCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCAGACAATG
GTCCGGAGGCCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTC
GCCCGGTCCTCACCCTCAGGGCTCCCGGGACCCATGCTGCGGTGGGGGACCTGCTGG
AGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCTCCCCTGATCCTGTACCGGTTTTTTCATGA
GGATGTCACCCTAGGAAATAGGTCGTCCCCCTCTGGAGGAGCGTCCTTAAACCTCTC
TCTGACTGCAGAGCACTCTGGAAACTACTCCTGTGAGGCCGACAATGGCCTCGGGGC
CCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATATCACAGGGCTGACCGCGAACAGAAGTG

Figura 35B

GCCCTTTTGCCACAGGAGTCGCCGGGGGCCTGCTCAGCATAGCAGGCCTTGCTGCGG
GGGCACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAGCCTGCCTCTG
ACCCCGCCAGGAGCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACCTATCACAATGTAC
CAGCCTGGGAAGAGCTGCAACCAGTGTACACTAATGCAAATCCTAGAGGAGAAAAT
GTGGTTTACTCAGAAGTACGGATCATCCAAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCT
GACCCCAGGCATCTCAGGAACAAGGGTTCCCCTATCATCTACTCTGAAGTTAAGGTG
GCGTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTGTTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCACAGATGAG
TCCACACGTCTCTCCAACTGCTGTTTCAGCCTCTGCACCCCAAAGTTCCCCTTGGGGG
AGAAGCAGCATTGAAGTGGGAAGATTTAGGCTGCCCCAGACCATATCTACTGGCCTT
TGTTTCACATGTCCTCATTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGGGCCCTGCTGGACTGTCA
CCTGTTTCCCAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTTAATCCAGTGGCAAGGTGCTC
CCACTCCAGGGCCCAGCACATCTCCTGGATTCCTTAGTGGGCTTCAGCTGTGATTGCT
GTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCCACAGAGGGGGTCTTACCACACAAAGGGA
GAGTGGGCCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCCTAACAGCTCAGGTGCTCCTAAACTCC
GACACAGAGTTCCTGCTTTGGGTGGATGCATTTCTCAATTGTCATCAGCCTGGTGGGG
CTACTGCAGTGTGCTGCCAAATGGGACAGCACACAGCCTGTGCACATGGGACATGTG
ATGGGTCTCCCCACGGGGGCTGCATTTCACACTCCTCCACCTGTCTCAAACTCTAAGG
TCGGCACTTGACACCAAGGTAACTTCTCTCCTGCTCATGTGTCAGTGTCTACCTGCCC
AAGTAAGTGGCTTTCATACACCAAGTCCCAAGTTCTTCCCATCCTAACAGAAGTAAC
CCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGGACCAGGGGTGCAGACAGAACACATACTGGAACAC
AGGAGGTGCTCAATTACTATTTGACTGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAG
AAAACTGTGGGTAATCAAACTGGCATAAAATCCAGTGCACTCCCTAGGAAATCCGGG
AGGTATTCTGGCTTCCCTAAGAAACAACGGAAGAGAAGGAGCTTGGATGAGGAAAC
TGTTCAGCAAGAGGAAGGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTTGTGGATCACCTGAGGA
TCCTGTGAAAATACAGATACTGATTCAGTGGGTCTGTGTAGAGCCTGAGACTGCCAT
TCTAACATGTTCCCAGGGGATGCTGATGCTGCTGGCCCTGGGACTGCACTGCATGCA
TGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGAATGTGTGGCTCTGGC
TGCCCAGGGCCCAACTCGGTTCACACGGATCGTGCTGCTCCCTGGCCAGCCTTTGGC
CACAGCACCACCAGCTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTCTGTGACATGTTGGCTTT
CATCAGCCACCCTGGGAAGCGGAAAGTAGCTGCCACTATCTTTGTTTCCCCACCTCA
GGCCTCACACTTTCCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCCATTC
AGAGTTGTTCTCCCATCTCTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCA
TCACATCTTATCTTGATCTTTGCTCCCAGTGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAGCCC
CACGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAAGGGCATTGGAAGCTCTCTCCACCTGAACCA
TGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTCAGGGCCTTGCCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGC
TGCCCCAACCTTTCAAGGAGGAAACCAGACACCTGAGACAGGAGCCTGTATGCAGC
CCAGTGCAGCCTTGCAGAGGACAAGGCTGGAGGCATTTGTCATCACTACAGATATGC
AACTAAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCACCGAGGCCGCTTTTTTAGG
CCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTAAAGAAAAA
AATCTGCTCACAGTTTGTTCTGGAGGTCACATCACCAACAAAGCTCACGCCCTATGC
AGTTCTGAGAAGGTGGAGGCACCAGGCTCAAAAGAGGAAATTTAGAATTTCTCATTG
GGAGAGTAAGGTACCCCCATCCCAGAATGATAACTGCACAGTGGCAGAACAAACTC
CACCCTAATGTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCCTGAGTGTAACAAAAGG
GCTTATTCTTCCTCAAGTAAGGGGGAACTCCTGCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTTC
TGCTTTCAGACGCAAACTGAAAAATGGCTCTTCTTGGGTCTTGAGCTTGCTGGCATAT
GGACTGAAAGAAACTATGCTATTGGATCTCCTGGATCTCCAGCTTGCTGACTGCAGA
TCTTGAGATATGTCAGCCTCTACAGTCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATC
TTTCTGTAAA

Figura 36

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLR
CRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIPHACLKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNTV
KIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCETQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWSLSP
NFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEGTK
VTLHCETQEDSLRTLYRFYHEGVPLRHKSVRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNGLGA
KPSKAVSLSVTVPVSHPVLNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAALERR
SANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSITVPVSHPVLTLSSAEALTF
EGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSFSLTEGHSGNYYCTADN
GFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELHCEAPRGSPPILYWFYHEDV
TLGSSSAPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRPILTFRAPR
AQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSLTTEHSGIYSCE
ADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPGTHAAVGDLLELHCEALRGSPLILYRFF
HEDVTLGNRSSPSGGASLNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYITGLTANRSGP
FATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLSRKAGRKPASDPARSPPDSDSQEPTYHNVPAWE
ELQPVYTNANPRGENVVYSEVRHQEKKKHAVASDPRHLRNKGSPHYSEVKVASTPVSG
SLFLASSAPHR

Figura 37

ATGCTGCTGTGGGTGATACTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGTAAGGACATAC
AAGTCCATTATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCGAGGAGAGAGAGTGAATCTG
ACTTGCAAGGGATTTGGCTTCTACTCATCACAAAAAACAAAATGGTACTATCGGCACCTTGGG
AAAGAAATATCGAGAGAAACCCAAAAAAATACCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAG
ATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGTCCTTGGACTTTTCTTCAGCTTCGCTG
ATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAG
GCGGAAGTAACACTGAAGACTACTATTTACAAGAATGAAAATGTCCTGGCATTTCTTAATAAA
TCAACTGACTTCCATATTTCTCATGCAAGTCTCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGAT
ATAAGGAAACTTGTTGCCTTGTTTCTTCCAACACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGTCATTTA
CACGTCCAGTGTTGAGAGTCAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAGCCCAGTGACCCTGACCT
GTGAGACCCAGCTCTCTCTAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCAGTTCTGCTTCTTCAGAAATG
ACCAGATGCTGGGATCAGGCTGCAGCCTCTCCCCGAAGTTCCGGATTACTGCCATGTGGAGTA
AAGATTCAGGATCCTACTGGTGTAAGGCAGCAACAATGTGTTATGACACCACATCTAACAGCT
TGAGATCCTGGATACAGGTGCTGATCCCCGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTCAGCCCTGAAA
AGGCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGAAACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGC
GCACTTTGTACAAGTTTTATCATGACGGTGTTCCCCTGAGGTACAAGTCAGTCCGCTGTGAAA
AGGGAGCATCCATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGCATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTG
ACAATGGCCATGGTGCCAAGCCCAGTGAGGCTGTAAGCCTGTCAGTCACTGTCCCTGTGTCTC
GCCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCAGAGGACCTGATTTCTGAGGGAGCCAAGTTGACACTTC
ACTGTGAAGCCCAGAGAGGTTCACTCCCCATCGTGTACCAGTTTCATCATGAGAATGCCTCCC
TGGGGAATAGGTCGGCCCACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGACC
ATTCGGGGAACTACTACTGCACAGCTAACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTGAGGCAGTG
AGCCTCTCCATCACTGTACCCGTGTCTCGTCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGA
CTTTTGAAGGAGCCACGGTGACACTTTACTGTGAGGTCCAGAGAGGTTCCCCACGAATCCTAT
ACCAGTTTTATCATGAGGACGTGCCCCTGGGGAGCAACTCAACACCCTCTGTGGGAAAAGTGT
CCTTCAGCTTCTCTCTGACTGCAGCACATTCAGGGAATTACTACTGCACAGCTGACAACGGCT
TTGGTCCCCAGCGCAGTGAGGCGGTGAGCCTCTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCT
CACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTTCTGGAGCTTCGCTGTGAGGC
CCTGAGAGGCTCTCCCCCGATCATGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGCAG
CTCAGTCCCCTCTGGAGGAGAAGCCTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAAA
CTACTCATGTGAGGCCAACAATGGCCTGGTGGCCCAGCACAGTGATACAATATCACTCAGTGT
TATAGTTCCAGTGTCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGAGCTCCCAGGGCCCAGGCTGTAGTGGG
GGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTTAT
CATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGAGCCTACTTCAACCTC
TCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCGGACAATGGTCTGGAGGCCCAG
CGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTCGCCCCGTCCTCACCCTCAGG
GCTCCCAGGGCCCAGGTTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGG
CTCTCCCCTGATCCTGTACCAGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTAGGAAATAGCTCAGCCCTC
TCTGGAGGAGCGTTCTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACACTCTGGAAACTACTCCTGTGAG
GCCGACAATGGTCTGGGGGCCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATCTCACAGGGCTGAC
CGAGAACAGAAGTGGCCCTGTTGCCACGGGTGTCACCGGGGGTCTGCTCAGCCTAGCAGGCC
TTGCTGCTGTGGCACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCAAGAAAAGCAGGGAGAGAGCCTGCCT
CTGACCCCTGCAGGAGCCCTTCAGACTTGGACTCCCAGGAGCCCACCTACCACAATGTACCAG
CCTGGGAAGAGCTGCAACCAGTGTACAGTAATGTGAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTAC
TCAGAAGTACGGATCATCCGAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCTAACCCCAGGCATCT
CAGGAACAAGGGTTCCTGTATCATCTACTCTGAAGTGAAGGTGGCATCAACCCCAGCCTCCAG
ATGCCTGTTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCACAGATGA

Figura 38

MLLWVILLVLAPVSGQFVRTYKSIIFLQPPWTTVFRGERVNLTCKGFGFYSSQKTKWYY
RHLGKEISRETQKNTLEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVSLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVV
LRCRAKAEVTLKTTIYKNENVLAFLNKSTDFHISHASLKDNGAYRCTGYKETCCLVSSNT
VKIQVQESFTRPVLRVSSFQPISGSPVTLTCETQLSLERSDVPLQFCFFRNDQMLGSGCSLS
PKFRITAMWSKDSGSYWCKAATMCYDTTSNSLRSWIQVLIPASHPVLTLSPEKALNFEGT
KVKLHCETQEDSLRTLYKFYHDGVPLRYKSVRCEKGASISFSLTTEHSGNYYCTADNGH
GAKPSEAVSLSVTVPVSRPVLTLSSAEDLISEGAKLTLHCEAQRGSLPIVYQFHHENASLG
NRSAHSAGGVAISFSLTADHSGNYYCTANNGFGPQRSEAVSLSITVPVSRPVLTLSSAEAL
TFEGATVTLYCEVQRGSPRILYQFYHEDVPLGSNSTPSVGKVSFSFSLTAAHSGNYYCTA
DNGFGPQRSEAVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELRCEALRGSPPIMYWFYHE
DVTLGSSSVPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRPILTFRA
PRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGAYFNLSLTTEHSGIY
SCEADNGLEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPRAQVAVGDLLELHCEALRGSPLILY
QFYHEDVTLGNSSALSGGAFFNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYLTGLTEN
RSGPVATGVTGGLLSLAGLAAVALLLYCWLSRKAGREPASDPCRSPSDLDSQEPTYHNV
PAWEELQPVYSNVNPRGENVVYSEVRIIREKKKHAVASNPRHLRNKGSCIIYSEVKVAST
PASRCLFLASSAPHR

Figura 39

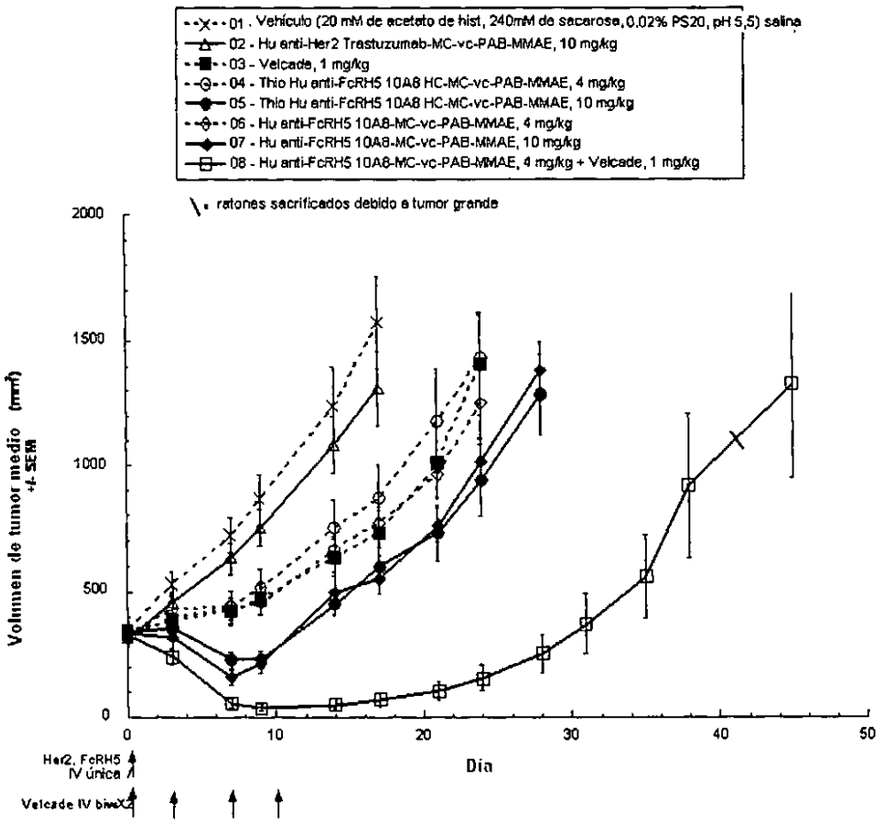

01 . Vehículo (20 mM de acetato de hist, 240mM de sacarose, 0.02% PS20, pH 5,5) salina
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
03 - Velcade, 1 mg/kg
04 - Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg
05 - Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg
07 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
08 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
ratones sacrificados debido a tumor grande
Volumen de tumor medio (mm³) +/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
Día
Her2, FcRH5 IV única
Velcade IV bixW2

Figura 40

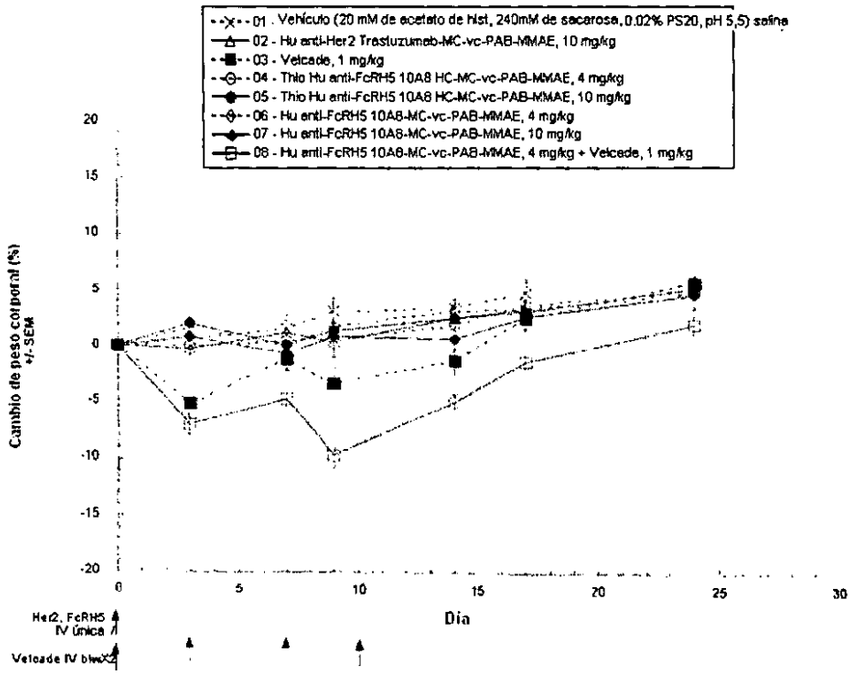

01 . Vehículo (20 mM de acetato de hist, 240mM de sacarosa, 0.02% PS20, pH 5,5) salina
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
03 - Velcade, 1 mg/kg
04 - Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg
05 - Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg
07 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 10 mg/kg
08 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 4 mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
Cambio de peso corporal (%) +/- SEM
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
5
10
15
20
25
30
Día
Her2, FcRH5 IV única
Velcade IV biw X2

Figura 41

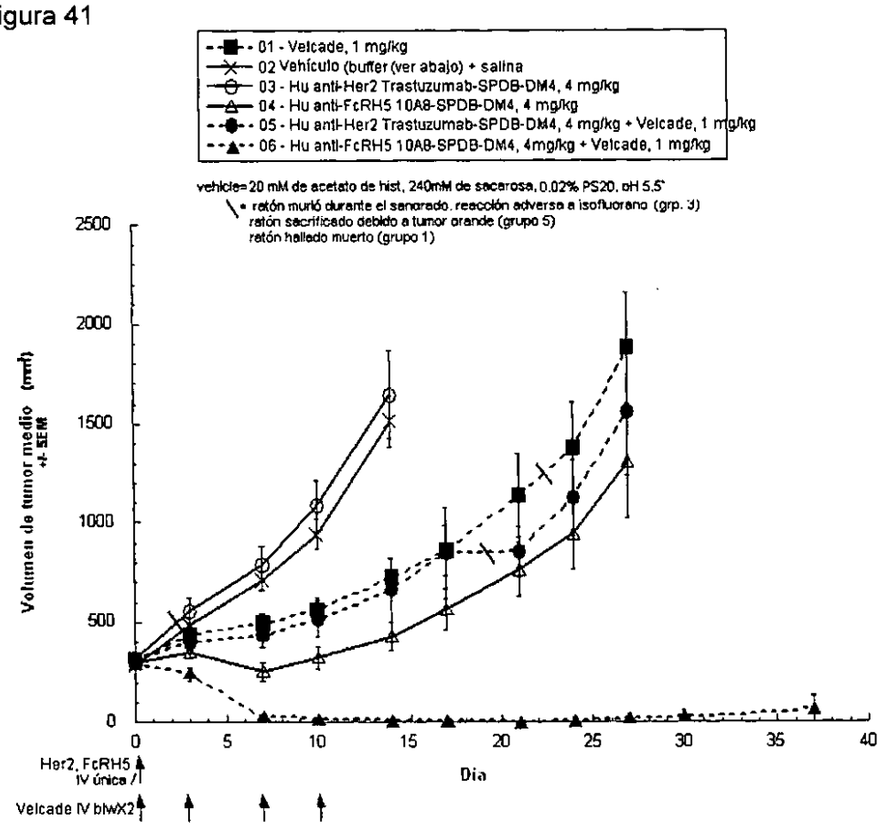

01 - Velcade, 1 mg/kg
02 Vehículo (buffer (ver abajo) + salina
03 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 4 mg/kg
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg
05 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 4 mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
vehicle=20 mM de acetato de hist, 240mM de sacarosa, 0.02% PS20, pH 5.5
* ratón murió durante el sangrado, reacción adversa a isofluorano (grp. 3)
ratón sacrificado debido a tumor grande (grupo 5)
ratón hallado muerto (grupo 1)
Volumen de tumor medio (mm³) +/- SEM
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Día
Her2, FcRH5 IV única
Velcade IV biWX2

Figura 42

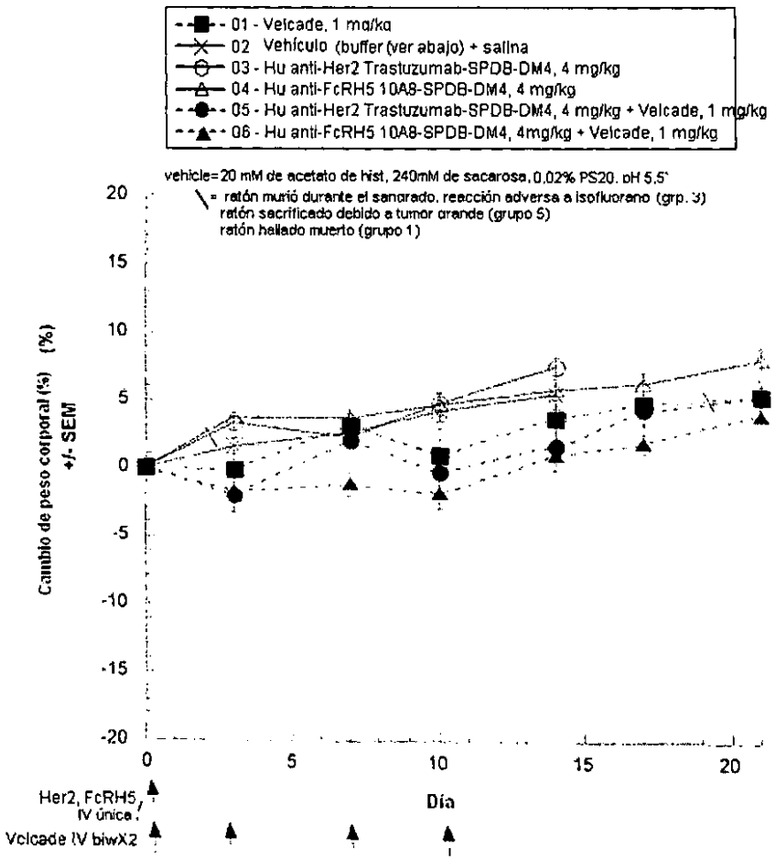

01 - Velcade, 1 mg/kg
02 Vehículo (buffer (ver abajo) + salina
03 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 4 mg/kg
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg
05 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 4 mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4mg/kg + Velcade, 1 mg/kg
vehicle=20 mM de acetato de hist, 240mM de sacarosa, 0.02% PS20. pH 5.5
= ratón murió durante el sangrado, reacción adversa a isofluorano (grp. 3)
ratón sacrificado debido a tumor grande (grupo 5)
ratón hallado muerto (grupo 1)
Cambio de peso corporal (%) +/- SEM
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
5
10
15
20
Día
Her2, FcRH5, IV única
Velcade IV biwX2

Figura 43

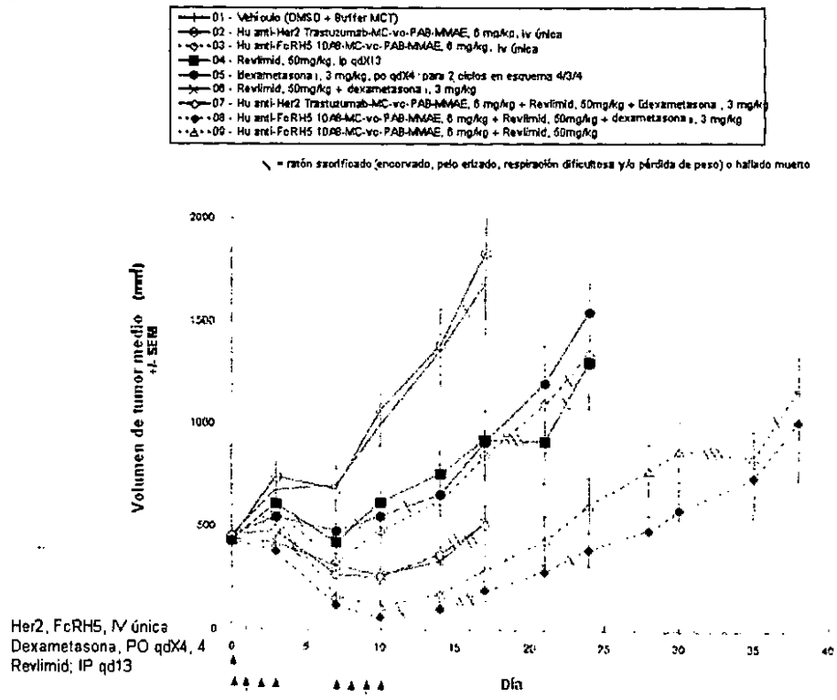
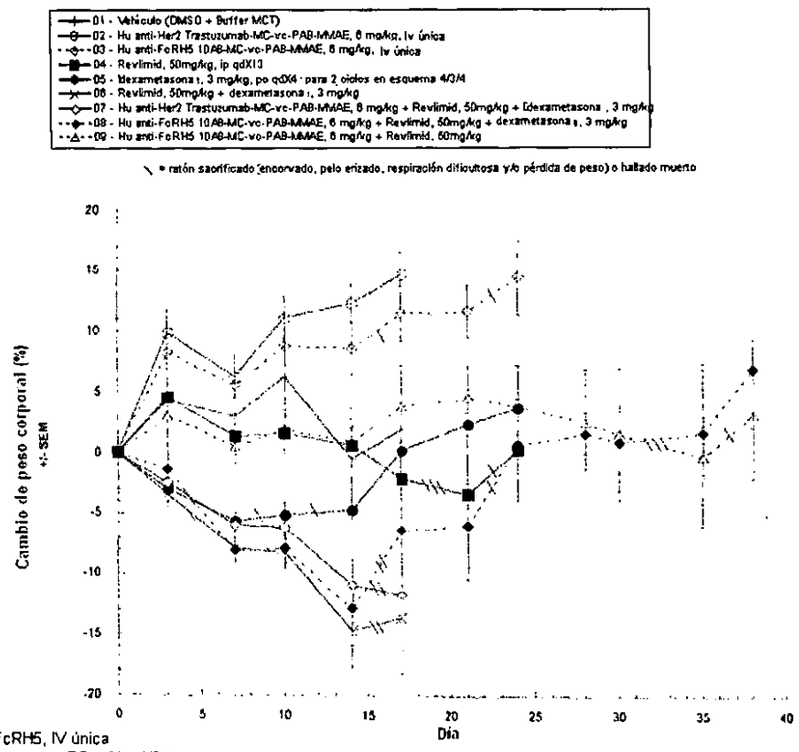

01 - Vehículo (DMSO + Buffer MCT)
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 6 mg/kg, iv única
03 - Hu anti-FcRH5 10A6-MC-vc-PAB-MMAE, 6 mg/kg, iv única
04 - Revlimid, 60mg/kg, ip qdX13
05 - Dexametasona ı, 3 mg/kg, po qdX4 · para 2 ciclos en esquema 4/3/4
06 - Revlimid, 60mg/kg + dexametasona ı, 3 mg/kg
07 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 6 mg/kg + Revlimid, 60mg/kg + Ldexametasona , 3 mg/kg
08 - Hu anti-FcRH5 10A6-MC-vc-PAB-MMAE, 6 mg/kg + Revlimid, 60mg/kg + dexametasona ı, 3 mg/kg
09 - Hu anti-FcRH5 10A6-MC-vc-PAB-MMAE, 6 mg/kg + Revlimid, 60mg/kg
\ = ratón sacrificado (encorvado, pelo erizado, respiración dificultosa y/o pérdida de peso) o hallado muerto
Volumen de tumor medio (mm³) +/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Día
Her2, FcRH5, IV única
Dexametasona, PO qdX4, 4
Revlimid; IP qd13

Figura 44



Her2, FcRH5, IV única
Dexametasona, PO qdX4, 4/3/4
Revlimid; IP qd13

Figura 45

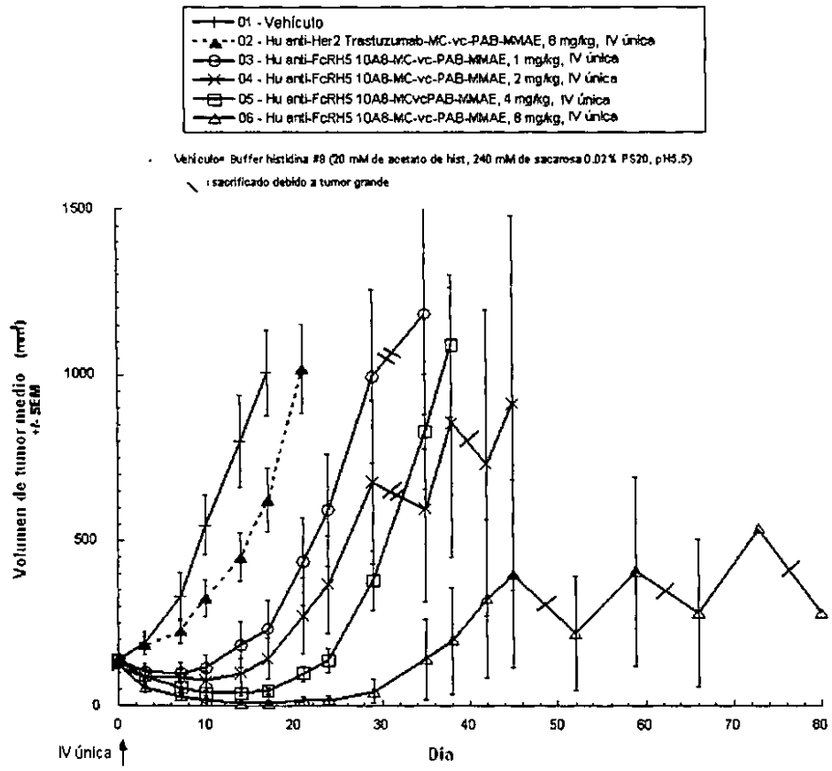

01 - Vehículo
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 8 mg/kg, IV única
03 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 1 mg/kg, IV única
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 2 mg/kg, IV única
05 - Hu anti-FcRH5 10A8-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg, IV única
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 8 mg/kg, IV única
Vehículo= Buffer histidina #8 (20 mM de acetato de hist, 240 mM de sacarosa 0.02% PS20, pH5.5)
= sacrificado debido a tumor grande
Volumen de tumor medio (mm³) +/- SEM
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
IV única
Día

Figura 46

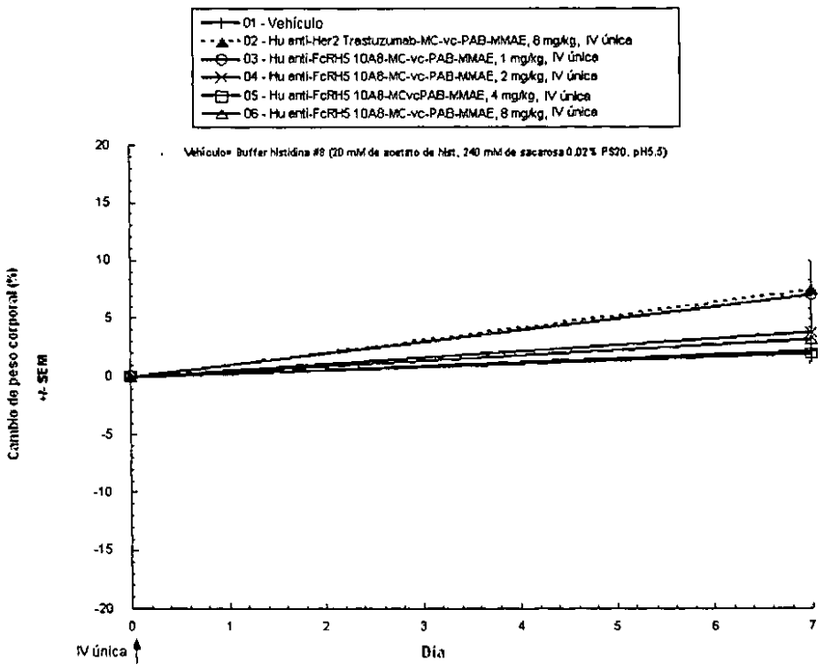

01 - Vehículo
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAE, 8 mg/kg, IV única
03 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 1 mg/kg, IV única
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 2 mg/kg, IV única
05 - Hu anti-FcRH5 10A8-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg, IV única
06 - Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 8 mg/kg, IV única
Vehículo= Buffer histidina #8 (20 mM de acetato de hist, 240 mM de sacarosa 0.02% PS20, pH5.5)
Cambio de peso corporal (%)
+/- SEM
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
1
2
3
4
5
6
7
IV única
Día

Figura 47

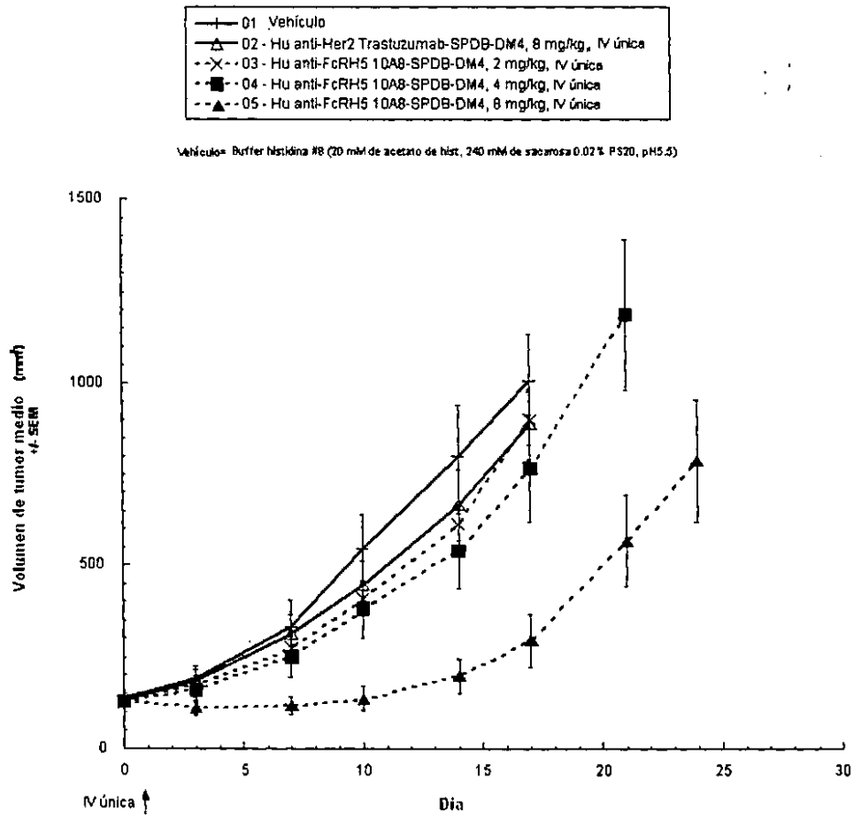
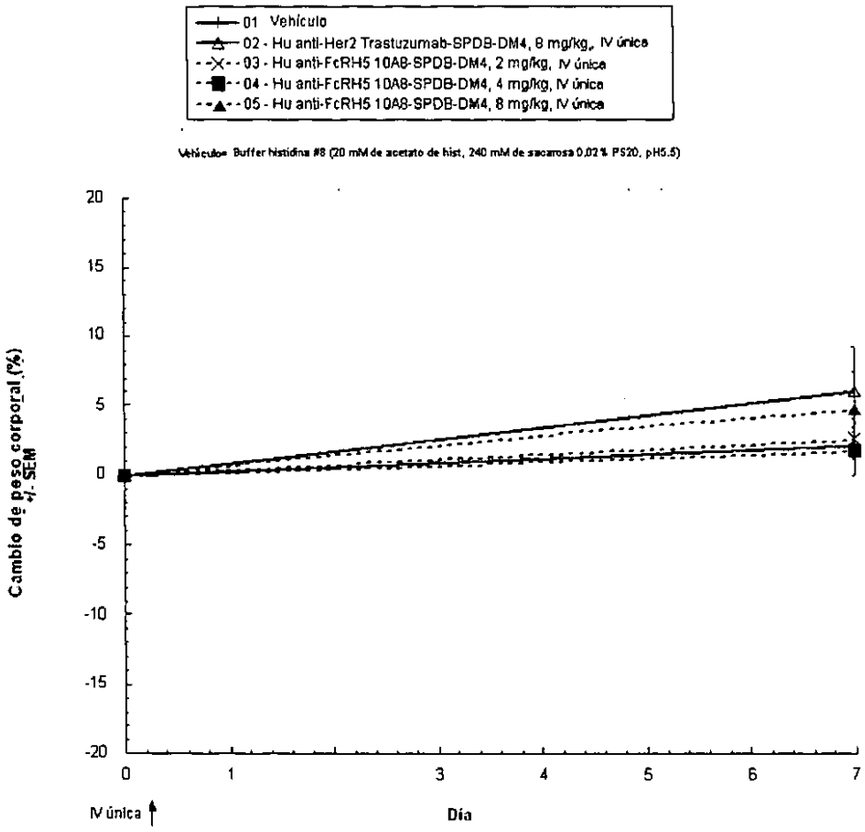

01 Vehículo
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 8 mg/kg, IV única
03 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 2 mg/kg, IV única
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg, IV única
05 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 8 mg/kg, IV única
Vehículo= Buffer histidina #8 (20 mM de acetato de hist, 240 mM de sacarosa 0.02% PS20, pH5.5)
Volumen de tumor medio (mm³) +/- SEM
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
IV única
Dia

Figura 48


01 Vehículo
02 - Hu anti-Her2 Trastuzumab-SPDB-DM4, 8 mg/kg, IV única
03 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 2 mg/kg, IV única
04 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg, IV única
05 - Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 8 mg/kg, IV única
Vehículo= Buffer histidina #8 (20 mM de acetato de hist, 240 mM de sacarosa 0.02% PS20, pH5.5)
Cambio de peso corporal (%) +/- SEM
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
1
3
4
5
6
7
IV única
Día

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELKINS, KRISTI
POLSON, ANDREW
EBENS, ALLEN
ADAMS, CAMELIA
ZHENG, BING
JUNUTULA, JAGATH R.
HONGO, JO-ANNE
WU, YAN

<120> ANTICUERPOS ANTI-FCRH5 E INMUNOCONJUGADOS Y MÉTODOS DE USO
<130> GNE-0350

<140> 61/266,972
<141> 2009-12-04

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 53
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: marca gD y secuencia señal sintética

<400> 1
Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val
1 5 10 15

Ile Val Gly His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser
20 25 30

Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Leu
50

<210> 2
<211> 30
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético
<400> 2
gatcgatatc ytgctsacmc artgtccagc 30

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 3
tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 4
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 4
gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg 37

<210> 5
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 5
acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 6
gatcgatatc gtgatgaccc artctcayaa 30

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 7
tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 8
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido sintético

<400> 8
gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg 37

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador de oligonucleótido

sintético

<400> 9
ctggwcaggg mtccagagtt cca 23

<210> 10
<211> 917
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena liviana de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch7D11)

<400> 10
cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg ggatggtcat 60

gtatcatcct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca ttcagatatc ctgctgacac 120

aatctccagc catcctgtct gtgagtccag gagaaagagt cagtttctcc tgcaggtcca 180

gtcagagcat tggcacaaac atacactggt atcagcaaag aacaaatggt tctccaaggc 240

ttctcataaa gtttgcttct gagtctctct ctgggatccc ttccaggttt agtggcagtg 300

gatcagggac agattttact cttagcatca atagtgtgga gtctgaagat tttgcagatt 360

actactgtca acaaagtaat agctggccac tcacgttcgg tgctggtacc aaggtggaga 420

tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga 480

aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag 540

tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc 600

aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 660

acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca 720

caaagagctt caacagggga gagtgttaag cttggccgcc atggcccaac ttgtttattg 780

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 840

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 900

tcgggaatta attcggc 917

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena liviana de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch7D11)

<400> 11
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 1484
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena pesada de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch7D11)

<400> 12
tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc 60

aactgcaact ggagcgtacg ctgaagtgca gttggtggag tctgggggag gcttagtgca 120

gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagctatgg 180

catgtcttgg gttcgccaga ctccagacaa gaggctggag ttggtcgcaa ccattactag 240

aaatggtggt accacctatt atctagacag tgtgaagggc cgattcacca tctccagaga 300

caatgccaag aacaccctgt acctgcaaat gagcagtctg aagtctgagg acacagccat 360

gtattactgt gcaagaggtc ctatctacta tgattacggc tatgctatgg actactgggg 420

tcaaggaacc acagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc 480

ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga 540

ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca 600

caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgactgt 660

gccctctagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 720

caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 780

gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa 840

ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca 900

cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa 960

gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg tcctcaccgt 1020

cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct 1080

cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1140

gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct 1200

ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga 1260

gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag 1320

caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat 1380

gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg 1440

agtgcgacgg ccctagagtc gacctgcaga agcttggccg ccat 1484

<210> 13
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena pesada de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch7D11)

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Thr Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 14
<211> 800
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena pesada de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch10A8)

<400> 14
acctcggttc tatcgattga attccaccat gggatggtca tgtatcatcc tttttctagt 60

agcaactgca actggagtac attcagatat cgtgatgacc cagtctcata aattcatgtc 120

cacatcagta agagacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc agtcaggatg tgagtactgc 180

tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa ctactgattt attcggcatc 240

ctaccggtac actggagtcc ctgatcgctt cactggcagt ggatctggga cggatttcac 300

tttcaccatc agcagtgtgc aggctgaaga cctggcagtt tattactgtc agcaacattt 360

tagtagtcct cggacgttcg gtggaggtac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc 420

accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcttctgt 480

tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa 540

cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 600

ctacagcctc agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta 660

cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 720

agagtgttaa gcttggccgc catggcccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 780

ataaagcaat agcatcacaa 800

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena liviana de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch10A8)

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 1499
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena pesada de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch10A8)

<400> 16
cacctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc ctttttctag 60

tagcaactgc aactggagcg tacgctgaag tgcagttggt ggagtctggg ggaggcttag 120

tgaagcctgg agggtccctg aaaatctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtagct 180

atgccgtgtc ttgggttcgc cagactccgg agaagaggct ggagtgggtc gctaccatta 240

gcagtggtgg tagtttgacc ttctatttag acagtgtgag gggtcgattc accatctcca 300

gagacaatgc caagaacacc ctgtacctgc aaatgagcag tctgaggtct gaagacacgg 360

ccatgtatta ctgtgcaagg cccattccgg attactatgc tttggactac tggggtcaag 420

gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac 480

cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact 540

tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct 600

tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 660

ctagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca 720

aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc 780

cagcacctga accctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac 840

cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga 900

ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa 960

gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca 1020

ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc 1080

ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac
1140

cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa 1200

aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 1260

ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct 1320

caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga 1380

ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg 1440

acggccctag agtcgacctg cagaagcttg gccgccatgg cccaacttgt ttattgcag 1499

<210> 17
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cadena
pesada de FcRH5 anti-humano quimérico sintética (ch10A8)

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 18
<211> 108

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (mu10A8)

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

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

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado sintetico Antibody (hu10A8.v1)

<400> 19
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

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

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado (mu10A8)

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR1-LC
de la cadena liviana del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR2-LC
de la cadena livina del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 23
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR3-LC de la cadena
liviana del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 24
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR4-LC de la cadena liviana del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 25
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 26
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 27
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 28
Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 29
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: CL1-LC del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 29
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado
(hu10A8.v1)

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

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

<210> 31
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR1-HC de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR2-HC de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 32
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR3-HC de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 33
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
1 5 10 15

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

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: FR4-HC de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 34

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

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 35
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 36
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 37
Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: CH1-HC del anticuerpo

humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 38
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 39
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Fc-HC del anticuerpo humanizado sintético (hu10A8.v1)

<400> 39
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 40
<211> 119
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado(hu10A8.v1)

<400> 40
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: ThioMab-hu10A8.v1-HC(A118C)-Cadena liviana sintética

<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 42
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: ThioMab-hu10A8.v1-HC(A118C)-Cadena pesada sintética

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 43
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C)-Cadena liviana sintética

<400> 43
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 44
<211> 449
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C)-Cadena pesada sintética

<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

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

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

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

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

Lys

<210> 45
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 47
<211> 32
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 49
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido de unión a albúmina sintético

<400> 53
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 54
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido de unión a albúmina sintético

<400> 54
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 55
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido de unión a albúmina sintético

<400> 55
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido de unión a albúmina sintético

<400> 56
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido de unión a albúmina sintético

<400> 57
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 58
<211> 684
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 58
gatgtgctcc ttggagctgg tgtgcagtgt cctgactgta agatcaagtc caaacctgtt 60

ttggaattga ggaaacttct cttttgatct cagcccttgg tggtccaggt cttcatgctc 120

tgtgggtgat attactggtc ctggctcctg tcagtggaca gtttgcaagg acacccaggc 180

ccattatttt cctccagcct ccatggacca cagtcttcca aggagagaga gtgaccctca 240

cttgcaaggg atttcgcttc tactcaccac agaaaacaaa atggtaccat cggtaccttg 300

ggaaagaaat actaagagaa accccagaca atatccttga ggttcaggaa tctggagagt 360

acagatgcca ggcccagggc tcccctctca gtagccctgt gcacttggat ttttcttcag 420

agatgggatt tcctcatgct gcccaggcta atgttgaact cctgggctca agtgatctgc 480

tcacctaggc ctctcaaagc gctgggatta cagcttcgct gatcctgcaa gctccacttt 540

ctgtgtttga aggagactct gtggttctga ggtgccgggc aaaggcggaa gtaacactga 600

ataatactat ttacaagaat gataatgtcc tggcattcct taataaaaga actgacttcc 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 684

<210> 59
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

His Leu Asp Phe Ser Ser Glu Met Gly Phe Pro His Ala Ala Gln Ala
100 105 110

Asn Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Thr
115 120

<210> 60
<211> 5392
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 60
aattcactaa tgcattctgc tctttttgag agcacagctt ctcagatgtg ctccttggag 60

ctggtgtgca gtgtcctgac tgtaagatca agtccaaacc tgttttggaa ttgaggaaac 120

ttctcttttg atctcagccc ttggtggtcc aggtcttcat gctgctgtgg gtgatattac 180

tggtcctggc tcctgtcagt ggacagtttg caaggacacc caggcccatt attttcctcc 240

agcctccatg gaccacagtc ttccaaggag agagagtgac cctcacttgc aagggatttc 300

gcttctactc accacagaaa acaaaatggt accatcggta cctcgggaaa gaaatactaa 360

gagaaacccc agacaatatc cttgaggttc aggaatctgg agagtacaga tgccaggccc 420

agggctcccc tctcagtagc cctgtgcact tggatttttc ttcagcttcg ctgatcctgc 480

aagctccact ttctgtgttt gaaggagact ctgtggttct gaggtgccgg gcaaaggcgg 540

aagtaacact gaataatact atttacaaga atgataatgt cctggcattc cttaataaaa 600

gaactgactt ccatattcct catgcatgtc tcaaggacaa tggtgcatat cgctgtactg 660

gatataagga aagttgttgc cctgtttctt ccaatacagt caaaatccaa gtccaagagc 720

catttacacg tccagtgctg agagccagct ccttccagcc catcagcggg aacccagtga 780

ccctgacctg tgagacccag ctctctctag agaggtcaga tgtcccgctc cggttccgct 840

tcttcagaga tgaccagacc ctgggattag gctggagtct ctccccgaat ttccagatta 900

ctgccatgtg gagtaaagat tcagggttct actggtgtaa ggcagcaaca atgcctcaca 960

gcgtcatatc tgacagcccg agatcctgga tacaggtgca gatccctgca tctcatcctg 1020

tcctcactct cagccctgaa aaggctctga attttgaggg aaccaaggtg acacttcact 1080

gtgaaaccca ggaagattct ctgcgcactt tgtacaggtt ttatcatgag ggtgtccccc 1140

tgaggcacaa gtcagtccgc tgtgaaaggg gagcatccat cagcttctca ctgactacag 1200

agaattcagg gaactactac tgcacagctg acaatggcct tggcgccaag cccagtaagg 1260

ctgtgagcct ctcagtcact gttcccgtgt ctcatcctgt cctcaacctc agctctcctg 1320

aggacctgat ttttgaggga gccaaggtga cacttcactg tgaagcccag agaggttcac 1380

tccccatcct gtaccagttt catcatgagg atgctgccct ggagcgtagg tcggccaact 1440

ctgcaggagg agtggccatc agcttctctc tgactgcaga gcattcaggg aactactact 1500

gcacagctga caatggcttt ggcccccagc gcagtaaggc ggtgagcctc tccatcactg 1560

tccctgtgtc tcatcctgtc ctcaccctca gctctgctga ggccctgact tttgaaggag 1620

ccactgtgac acttcactgt gaagtccaga gaggttcccc acaaatccta taccagtttt 1680

atcatgagga catgcccctg tggagcagct caacaccctc tgtgggaaga gtgtccttca 1740

gcttctctct gactgaagga cattcaggga attactactg cacagctgac aatggctttg 1800

gtccccagcg cagtgaagtg gtgagccttt ttgtcactgt tccagtgtct cgccccatcc 1860

tcaccctcag ggttcccagg gcccaggctg tggtggggga cctgctggag cttcactgtg 1920

aggccccgag aggctctccc ccaatcctgt actggtttta tcatgaggat gtcaccctgg 1980

ggagcagctc agccccctct ggaggagaag cttctttcaa cctctctctg actgcagaac 2040

attctggaaa ctactcatgt gaggccaaca atggcctagt ggcccagcac agtgacacaa 2100

tatcactcag tgttatagtt ccagtatctc gtcccatcct caccttcagg gctcccaggg 2160

cccaggctgt ggtgggggac ctgctggagc ttcactgtga ggccctgaga ggctcctccc 2220

caatcctgta ctggttttat catgaagatg tcaccctggg taagatctca gccccctctg 2280

gaggaggggc ctccttcaac ctctctctga ctacagaaca ttctggaatc tactcctgtg 2340

aggcagacaa tggtccggag gcccagcgca gtgagatggt gacactgaaa gttgcagttc 2400

cggtgtctcg cccggtcctc accctcaggg ctcccgggac ccatgctgcg gtgggggacc 2460

tgctggagct tcactgtgag gccctgagag gctctcccct gatcctgtac cggttttttc 2520

atgaggatgt caccctagga aataggtcgt ccccctctgg aggagcgtcc ttaaacctct 2580

ctctgactgc agagcactct ggaaactact cctgtgaggc cgacaatggc ctcggggccc 2640

agcgcagtga gacagtgaca ctttatatca cagggctgac cgcgaacaga agtggccctt 2700

ttgccacagg agtcgccggg ggcctgctca gcatagcagg ccttgctgcg ggggcactgc 2760

tgctctactg ctggctctcg agaaaagcag ggagaaagcc tgcctctgac cccgccagga 2820

gccctccaga ctcggactcc caagagccca cctatcacaa tgtaccagcc tgggaagagc 2880

tgcaaccagt gtacactaat gcaaatccta gaggagaaaa tgtggtttac tcagaagtac 2940

ggatcatcca agagaaaaag aaacatgcag tggcctctga ccccaggcat ctcaggaaca 3000

agggttcccc tatcatctac tctgaagtta aggtggcgtc aaccccggtt tccggatccc 3060

tgttcttggc ttcctcagct cctcacagat gagtccacac gtctctccaa ctgctgtttc 3120

agcctctgca ccccaaagtt cccttgggg gagaagcagc attgaagtgg gaagatttag 3180

gctgccccag accatatcta ctggcctttg tttcacatgt cctcattctc agtctgacca 3240

gaatgcaggg ccctgctgga ctgtcacctg tttcccagtt aaagccctga ctggcaggtt 3300

ttttaatcca gtggcaaggt gctcccactc cagggcccag cacatctcct ggattcctta 3360

gtgggcttca gctgtgattg ctgttctgag tactgctctc atcacacccc cacagagggg 3420

gtcttaccac acaaagggag agtgggcctt caggagatgc cgggctggcc taacagctca 3480

ggtgctccta aactccgaca cagagttcct gctttgggtg gatgcatttc tcaattgtca 3540

tcagcctggt ggggctactg cagtgtgctg ccaaatggga cagcacacag cctgtgcaca 3600

tgggacatgt gatgggtctc cccacggggg ctgcatttca cactcctcca cctgtctcaa 3660

actctaaggt cggcacttga caccaaggta acttctctcc tgctcatgtg tcagtgtcta 3720

cctgcccaag taagtggctt tcatacacca agtcccaagt tcttcccatc ctaacagaag 3780

taacccagca agtcaaggcc aggaggacca ggggtgcaga cagaacacat actggaacac 3840

aggaggtgct caattactat ttgactgact gactgaatga atgaatgaat gaggaagaaa 3900

actgtgggta atcaaactgg cataaaatcc agtgcactcc ctaggaaatc cgggaggtat 3960

tctggcttcc ctaagaaaca acggaagaga aggagcttgg atgaggaaac tgttcagcaa 4020

gaggaagggc ttctcacact ttcatgtgct tgtggatcac ctgaggatcc tgtgaaaata 4080

cagatactga ttcagtgggt ctgtgtagag cctgagactg ccattctaac atgttcccag 4140

gggatgctga tgctgctggc cctgggactg cactgcatgc atgtgaagcc ctataggtct 4200

cagcagaggc ccatggagag ggaatgtgtg gctctggctg cccagggccc aactcggttc 4260

acacggatcg tgctgctccc tggccagcct ttggccacag caccaccagc tgctgttgct 4320

gagagagctt cttctctgtg acatgttggc tttcatcagc caccctggga agcggaaagt 4380

agctgccact atctttgttt ccccacctca ggcctcacac tttcccatga aaagggtgaa 4440

tgtatataac ctgagccctc tccattcaga gttgttctcc catctctgag caatgggatg 4500

ttctgttccg cttttatgat atccatcaca tcttatcttg atctttgctc ccagtggatt 4560

gtacagtgat gacttttaag ccccacggcc ctgaaataaa atccttccaa gggcattgga 4620

agctctctcc acctgaacca tggcttttca tgcttccaag tgtcagggcc ttgcccagat 4680

agacagggct gactctgctg ccccaacctt tcaaggagga aaccagacac ctgagacagg 4740

agcctgtatg cagcccagtg cagccttgca gaggacaagg ctggaggcat ttgtcatcac 4800

tacagatatg caactaaaat agacgtggag caagagaaat gcattcccac cgaggccgct 4860

tttttaggcc tagttgaaag tcaagaagga cagcagcaag cataggctca ggattaaaga 4920

aaaaaatctg ctcacagttt gttctggagg tcacatcacc aacaaagctc acgccctatg 4980

cagttctgag aaggtggagg caccaggctc aaaagaggaa atttagaatt tctcattggg 5040

agagtaaggt acccccatcc cagaatgata actgcacagt ggcagaacaa actccaccct 5100

aatgtgggtg gaccccatcc agtctgttga aggcctgagt gtaacaaaag ggcttattct 5160

tcctcaagta agggggaact cctgctttgg gctgggacat aagtttttct gctttcagac 5220

gcaaactgaa aaatggctct tcttgggtct tgagcttgct ggcatatgga ctgaaagaaa 5280

ctatgctatt ggatctcctg gatctccagc ttgctgactg cagatcttga gatatgtcag 5340

cctctacagt cacaagagct aattcattct aataaaccaa tctttctgta aa 5392

<210> 61
<211> 977
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
115 120 125

Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe
130 135 140

Leu Asn Lys Arg Thr Asp Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp
145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
245 250 255

Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile Ser Asp
260 265 270

Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
290 295 300

Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg
305 310 315 320

Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu
370 375 380

Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val
485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met
500 505 510

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser
515 520 525

Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr
545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly
580 585 590

Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
595 600 605

Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
610 615 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
625 630 635 640

Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
645 650 655

Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
660 665 670

Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
675 680 685

Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
690 695 700

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
705 710 715 720

His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala Gln
725 730 735

Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
740 745 750

Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu
755 760 765

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
770 775 780

Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser
785 790 795 800

Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
805 810 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
820 825 830

Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe
835 840 845

Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala
850 855 860

Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys
865 870 875 880

Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
900 905 910

Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
915 920 925

Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 62
<211> 2934
<212> ADN
<213> Macaca fascicularis

<400> 62
atgctgctgt gggtgatact actggtcctg gctcctgtca gtggacagtt tgtaaggaca 60

tacaagtcca ttattttcct ccagcctcca tggaccacag tcttccgagg agagagagtg 120

aatctgactt gcaagggatt tggcttctac tcatcacaaa aaacaaaatg gtactatcgg 180

caccttggga aagaaatatc gagagaaacc caaaaaaata cccttgaggt tcaggaatct 240

ggagagtaca gatgccaggc ccagggctcc cctctcagta gccctgtgtc cttggacttt 300

tcttcagctt cgctgatcct gcaagctcca ctttctgtgt ttgaaggaga ctctgtggtt 360

ctgaggtgcc gggcaaaggc ggaagtaaca ctgaagacta ctatttacaa gaatgaaaat 420

gtcctggcat ttcttaataa atcaactgac ttccatattt ctcatgcaag tctcaaggac 480

aatggtgcat atcgctgtac tggatataag gaaacttgtt gccttgtttc ttccaacaca 540

gtcaaaatcc aagtccaaga gtcatttaca cgtccagtgt tgagagtcag ctccttccag 600

cccatcagcg ggagcccagt gaccctgacc tgtgagaccc agctctctct agagaggtca 660

gatgtcccgc tccagttctg cttcttcaga aatgaccaga tgctgggatc aggctgcagc 720

ctctccccga agttccggat tactgccatg tggagtaaag attcaggatc ctactggtgt 780

aaggcagcaa caatgtgtta tgacaccaca tctaacagct tgagatcctg gatacaggtg 840

ctgatccccg catctcatcc tgtcctcact ctcagccctg aaaaggctct gaattttgag 900

ggaaccaagg tgaaacttca ctgtgaaacc caggaagatt ctctgcgcac tttgtacaag 960

ttttatcatg acggtgttcc cctgaggtac aagtcagtcc gctgtgaaaa gggagcatcc 1020

atcagcttct cactgactac agagcattca gggaactact actgcacagc tgacaatggc 1080

catggtgcca agcccagtga ggctgtaagc ctgtcagtca ctgtccctgt gtctcgccct 1140

gtcctcaccc tcagctctgc agaggacctg atttctgagg gagccaagtt gacacttcac 1200

tgtgaagccc agagaggttc actccccatc gtgtaccagt ttcatcatga gaatgcctcc 1260

ctggggaata ggtcggccca ctctgcagga ggagtggcca tcagcttctc tctgactgca 1320

gaccattcgg ggaactacta ctgcacagct aacaatggct ttggccccca gcgcagtgag 1380

gcagtgagcc tctccatcac tgtacccgtg tctcgtcctg tcctcaccct cagctctgct 1440

gaggccctga cttttgaagg agccacggtg acactttact gtgaggtcca gagaggttcc 1500

ccacgaatcc tataccagtt ttatcatgag gacgtgcccc tggggagcaa ctcaacaccc 1560

tctgtgggaa aagtgtcctt cagcttctct ctgactgcag cacattcagg gaattactac 1620

tgcacagctg acaacggctt tggtccccag cgcagtgagg cggtgagcct ctttgtcact 1680

gttccagtgt ctcgccccat cctcaccctc agggttccca gggcccaggc tgtggtgggg 1740

gaccttctgg agcttcgctg tgaggccctg agaggctctc ccccgatcat gtactggttt 1800

tatcatgagg atgtcaccct ggggagcagc tcagtcccct ctggaggaga agcctctttc 1860

aacctctctc tgactgcaga acattctgga aactactcat gtgaggccaa caatggcctg 1920

gtggcccagc acagtgatac aatatcactc agtgttatag ttccagtgtc tcgtcccatc 1980

ctcaccttca gagctcccag ggcccaggct gtagtggggg acctgctgga gcttcactgt 2040

gaggccctga gaggctcctc cccaatcctg tactggtttt atcatgaaga tgtcaccctg 2100

ggtaagatct cagccccctc tggaggagga gcctacttca acctctctct gactacagaa 2160

cattctggaa tctactcctg tgaggcggac aatggtctgg aggcccagcg cagtgagatg 2220

gtgacactga aagttgcagt tccggtgtct cgccccgtcc tcaccctcag ggctcccagg 2280

gcccaggttg cggtggggga cctgctggag cttcactgtg aggccctgag aggctctccc 2340

ctgatcctgt accagtttta tcatgaggat gtcaccctag gaaatagctc agccctctct 2400

ggaggagcgt tcttcaacct ctctctgact gcagaacact ctggaaacta ctcctgtgag 2460

gccgacaatg gtctgggggc ccagcgcagt gagacagtga cactttatct cacagggctg 2520

accgagaaca gaagtggccc tgttgccacg ggtgtcaccg ggggtctgct cagcctagca 2580

ggccttgctg ctgtggcact gctgctctac tgctggctct caagaaaagc agggagagag 2640

cctgcctctg acccctgcag gagcccttca gacttggact cccaggagcc cacctaccac 2700

aatgtaccag cctgggaaga gctgcaacca gtgtacagta atgtgaatcc tagaggagaa 2760

aatgtggttt actcagaagt acggatcatc cgagagaaaa agaaacatgc agtggcctct 2820

aaccccaggc atctcaggaa caagggttcc tgtatcatct actctgaagt gaaggtggca 2880

tcaaccccag cctccagatg cctgttcttg gcttcctcag ctcctcacag atga 2934

<210> 63
<211> 977
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 63
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Val Arg Thr Tyr Lys Ser Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Arg Gly Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Lys Gly Phe Gly
35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Trp Tyr Tyr Arg His Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Ser Arg Glu Thr Gln Lys Asn Thr Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

Ser Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
115 120 125

Val Thr Leu Lys Thr Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Val Leu Ala Phe
130 135 140

Leu Asn Lys Ser Thr Asp Phe His Ile Ser His Ala Ser Leu Lys Asp
145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Thr Cys Cys Leu Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Ser Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Val Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Ser Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asn Asp Gln Met Leu Gly Ser Gly Cys Ser
225 230 235 240

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

Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Cys Tyr Asp Thr Thr Ser Asn
260 265 270

Ser Leu Arg Ser Trp Ile Gln Val Leu Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val

290 295 300

Lys Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Lys
305 310 315 320

Phe Tyr His Asp Gly Val Pro Leu Arg Tyr Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Lys Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly His Gly Ala Lys Pro Ser Glu Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
370 375 380

Ser Ser Ala Glu Asp Leu Ile Ser Glu Gly Ala Lys Leu Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Val Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Asn Ala Ser Leu Gly Asn Arg Ser Ala His Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Asp His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asn Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu Tyr Cys Glu Val
485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Arg Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val
500 505 510

Pro Leu Gly Ser Asn Ser Thr Pro Ser Val Gly Lys Val Ser Phe Ser
515 520 525

Phe Ser Leu Thr Ala Ala His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu Phe Val Thr
545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu Arg Cys Glu Ala Leu Arg Gly
580 585 590

Ser Pro Pro Ile Met Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
595 600 605

Ser Ser Ser Val Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
610 615 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
625 630 635 640

Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
645 650 655

Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
660 665 670

Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
675 680 685

Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser

690 695 700

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Tyr Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
705 710 715 720

His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Glu Ala Gln
725 730 735

Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
740 745 750

Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Val Ala Val Gly Asp Leu
755 760 765

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
770 775 780

Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Leu Ser
785 790 795 800

Gly Gly Ala Phe Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
805 810 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
820 825 830

Val Thr Leu Tyr Leu Thr Gly Leu Thr Glu Asn Arg Ser Gly Pro Val
835 840 845

Ala Thr Gly Val Thr Gly Gly Leu Leu Ser Leu Ala Gly Leu Ala Ala
850 855 860

Val Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Glu
865 870 875 880

Pro Ala Ser Asp Pro Cys Arg Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ser Gln Glu
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
900 905 910

Ser Asn Val Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
915 920 925

Ile Ile Arg Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asn Pro Arg His
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Cys Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Ala Ser Arg Cys Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 64
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 65
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 65
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Xaa Gly Xaa Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-147461- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 17:45:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 679

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

☐	Indicación que solicita una patente
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art .33 Decisión 486/00, Circular Única**

1 ☒	Indicación que se solicita una PCT
86 ☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
569 ☒	Dibujos de ser estos pertinentes.
2 ☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación grafica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐