

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 962 874**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014 E 20169942 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3736291**

(54) Título: **Anticuerpos anti-FcRH5**

(30) Prioridad:

24.06.2013 US 201361838534 P

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

21.03.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**EBENS, ALLEN J., JR.;
HAZEN, MEREDITH C.;
HONGO, JO-ANNE;
JOHNSTON, JENNIFER W.;
JUNTTILA, TEEMU T.;
LI, JI y
POLSON, ANDREW G.**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 962 874 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-FcRH5

5 Campo de la invención

En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) e inmunoconjungados y métodos de uso de los mismos.

10 Antecedentes

5 de tipo receptor de Fc (FcRL5, también conocido como FcRH5 e IRTA2) pertenece a una familia de 6 genes recientemente identificados de la superfamilia de la inmunoglobulina (IgSF). Esta familia de genes está estrechamente relacionada con los receptores de Fc con la estructura genómica conservada, composición de dominio de Ig extracelular y los motivos de señalización de tipo ITIM e ITAM (Davis RS et al., Eur J Immunol (2005) 35:674-80). Los miembros de esta familia también han sido llamados IFGP (de superfamilia de Ig, FcR, gp42) y SPAP (proteínas de anclaje de fosfatasa que contienen de dominio SH2). Se han descrito seis miembros de la familia de receptores de FcRH/IRTA: FcRH1/IRTA5, FcRH2/IRTA4, FcRH3/IRTA3, FcRH4/IRTA1, FcRH5/IRTA2 y FcRH6 (Polson AG et al., Int. Immunol. (2006) 18(9):1363-1373). Todos los FcRH/IRTA contienen alguna combinación de motivos inhibidores basados en tirosina de inmunorreceptor canónicos y motivos de señalización de 'tipo motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor'. Los ADNc de FcRH codifican glucoproteínas transmembranarias de tipo I con múltiples dominios extracelulares de tipo Ig y dominios citoplásmicos que contienen motivos de señalización activantes y/o inhibidores basados en tirosina de inmunorreceptor consenso. Los genes de FcRH están estructuralmente relacionados, y sus productos de proteína comparten el 28-60 % de identidad extracelular entre sí. También comparten el 15-31 % de identidad con sus parientes de FcR más próximos. Hay un alto grado de homología entre los diferentes FcRH.

El (Los) ligando(s) para FcRH5 son desconocidos, pero FcRH5 participa en la proliferación potenciada y expresión de isotipo en la dirección 3' durante el desarrollo de los linfocitos B sensibilizados con antígeno (Dement-Brown J. et al., J Leukoc Biol (2012) 91:59-67). El locus de FcRH5 tiene tres isoformas de ARNm principales (FcRH5a, FcRH5b y FcRH5c). Las principales isoformas de la proteína FcRH5 codificadas por estos transcritos comparten una secuencia de aminoácidos común hasta el resto 560, presentando un péptido señal común y seis dominios extracelulares de tipo Ig. FcRH5a representa una glucoproteína secretada de 759 aminoácidos con ocho dominios de tipo Ig, seguido de 13 aminoácidos predominantemente polares únicos en su extremo C. FcRH5b diverge de FcRH5a en el resto de aminoácido 560 y se extiende durante un corto tramo de 32 restos adicionales, cuya hidrofobia es compatible con su enlace a la membrana plasmática mediante un anclaje de GPI. FcRH5c es la isoforma más larga cuya secuencia se desvía de FcRH5a en el aminoácido 746. FcRH5c codifica una glucoproteína transmembranaria de tipo I de 977 aa con nueve dominios extracelulares de tipo Ig, que alojan ocho posibles sitios de glucosilación unidos en N, un dominio transmembranario de 23 aminoácidos y uno citoplásmico de 104 aminoácidos con tres motivos de unión SH2 consenso con el consenso ITIM.

Los genes FcRH están agrupados juntos en medio de los genes FcR clásicos, FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcεRI, en la región 1q21-23 del cromosoma 1. Esta región contiene 1 de las anomalías cromosómicas secundarias más frecuentes asociadas al fenotipo maligno en tumores hematopoyéticos, especialmente en mieloma múltiple (Hatzivassiliou G. et al., Immunity (2001) 14:277-89). FcRH5 se expresa solo en el linaje de linfocitos B, empezando tan pronto como pre-linfocitos B, pero no obtiene la expresión completa hasta la etapa de linfocito B maduro. A diferencia de la mayoría de las otras proteínas de la superficie específicas de linfocitos B conocidas (por ejemplo, CD20, CD 19 y CD22), FcRH5 continúa expresándose en las células plasmáticas mientras que otros marcadores específicos de linfocitos B se regulan por disminución (Polson AG et al., Int Immunol (2006) 18:1363-73). Además, el ARNm de FcRH5 se expresa en exceso en múltiples líneas de células de mieloma con anomalías 1q21 como se detectan por matrices de oligonucleótidos (Inoue J., Am J Pathol (2004) 165:71-81). El patrón de expresión indica que FcRH5 podría ser una diana para terapias basadas en anticuerpos para el tratamiento de mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un tumor maligno de células plasmáticas caracterizado por lesiones esqueléticas, insuficiencia renal, anemia e hipercalcemia. Es esencialmente incurable por las actuales terapias. Los actuales tratamientos con fármacos para el mieloma múltiple incluyen combinaciones del inhibidor del proteosoma bortezomib (Velcade), el inmunomodulador lenalidomida (Revlimid) y el esteroide dexametasona. El documento WO2006/039238 desvela anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de FcRH5 que no son capaces de unirse específicamente a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5.

60 Las terapias basadas en anticuerpos específicos contra FcRH5c y métodos de detección pueden ser particularmente eficaces, ya que reconocen específicamente célula diana, FcRH5 asociada a membrana en vez de anticuerpos que reconocen tanto isoformas solubles como de membrana de FcRH5. Sin embargo, solo el último dominio de tipo Ig de FcRH5 (dominio 9 de tipo Ig) es la región extracelular única que diferencia entre las tres isoformas principales de FcRH5, y hay homología significativa entre los dominios de tipo Ig dentro de FcRH5. Además, el último dominio de tipo Ig está altamente conservado entre FcRH1, FcRH2, FcRH3 y FcRH5. Cualquier terapia basada en anticuerpos que se dirija específicamente a FcRH5 tendría que tener reactividad cruzada mínima con otras FcRH para evitar

efectos inespecíficos adversos (por ejemplo, FcRH3 se expresa en linfocitos NK normales). Existe una necesidad en la materia de agentes que ayuden en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer asociado a FcRHS.

5 Sumario

En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-FcRH5 que incluyen anticuerpos biespecíficos, inmunoconjungados y métodos de producción de los mismos.

10 En el presente documento se proporciona una formulación farmacéutica que comprende:

(a) un anticuerpo anti-FcRH5 que se une a una región específica de la isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c y no se une significativamente a otro dominio de tipo Ig de FcRH5, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se produce mediante un método que comprende las etapas de:

15 (i) cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-FcRH5 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-FcRH5; y

(ii) recuperar el anticuerpo anti-FcRH5 de la célula hospedadora o del medio de la célula hospedadora, en donde la región específica de la isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c se selecciona del grupo

20 que consiste en:

(I) aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1;

(II) aminoácidos 745-851 de SEQ ID NO: 1;

(III) aminoácidos 752-834 de SEQ ID NO: 1; y

25 (IV) los aminoácidos 754-835 de la SEQ ID NO: 1; y

(b) un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

30 En otro aspecto, la formulación farmacéutica es para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer FcRH5-positiva, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica.

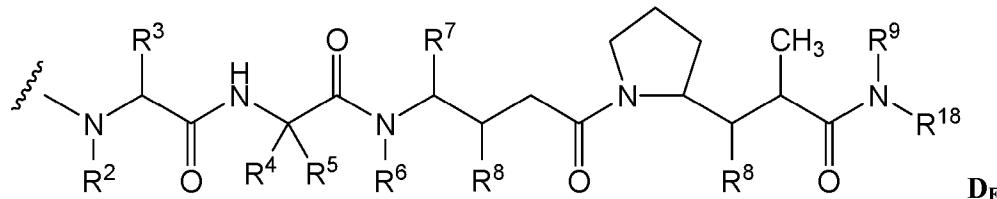
35 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o químico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a FcRH5. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una o más de las siguientes características: a) reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa, b) no reacciona de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4, c) se une a FcRH5 endógena, d) no reacciona de forma cruzada con FcRH5a, y e) no reacciona de forma cruzada con otro dominio de tipo Ig de FcRH5.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a FcRH5 y CD3.

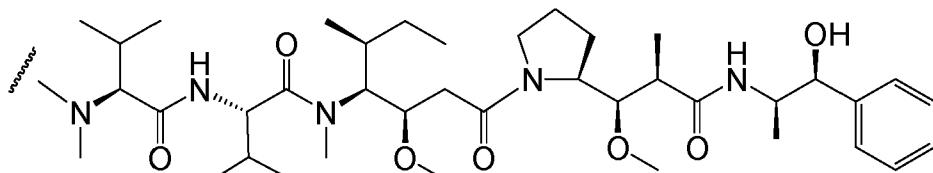
45 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico.

50 En algunas realizaciones, se proporcionan inmunoconjungados. En algunas realizaciones, un inmunoconjungado comprende un anticuerpo anti-FcRH5 y un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En algunas realizaciones, un inmunoconjungado tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que: (a) Ab es un anticuerpo descrito en el presente documento; (b) L es un conector; (c) D es un fármaco seleccionado de un maitansinoide, una auristatina, una caliqueamicina, una pirrolobenzodiazepina y un derivado de nemorubicina; y (d) p oscila de 1-8. En algunas realizaciones, D es una auristatina. En algunas realizaciones tales, D tiene la fórmula D_E



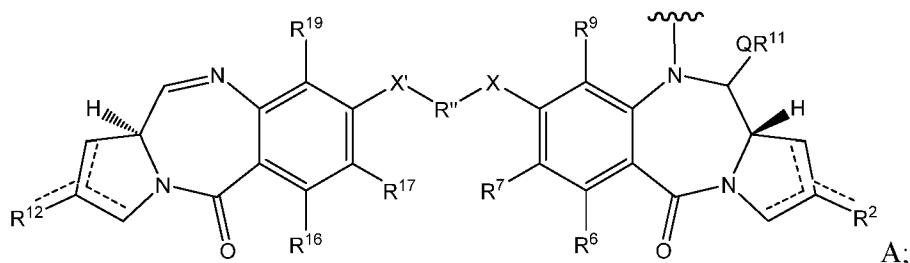
en la que R² y R⁶ son cada uno metilo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es H, R⁷ es sec-butilo, cada R⁸ está

seleccionado independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R⁹ es H; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo. En algunas realizaciones, D es MMAE que tiene la estructura:

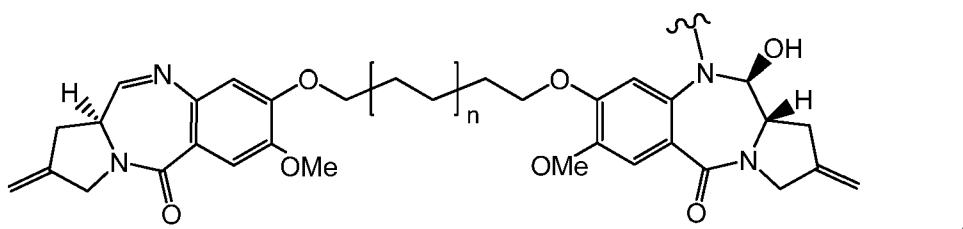


5

En algunas realizaciones, D es una pirrolobenzodiazepina de fórmula A:



- 10 en la que las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3; R² está seleccionado independientemente de H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente adicionalmente seleccionados de halógeno o dihalógeno, en la que R^D está seleccionado independientemente de R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halógeno; R⁶ y R⁹ están seleccionados independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halógeno; R⁷ está seleccionado independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halógeno; Q está seleccionado independientemente de O, S y NH; R¹¹ es cualquiera de H o R o, donde Q es O, SO₃M, donde M es un catión metálico; R y R' están seleccionados cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₈, alquilo C₁₋₁₂, heterociclo C₃₋₈, heterociclo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos, y opcionalmente en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido; R¹², R¹⁶, R¹⁹ y R¹⁷ son como se definen para R², R⁶, R⁹ y R⁷ respectivamente; R'' es un grupo alquíleno C₃₋₁₂, cuya cadena puede interrumpirse por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos que están opcionalmente sustituidos; y X y X' están seleccionados independientemente de O, S y N(H). En algunas realizaciones tales, D es

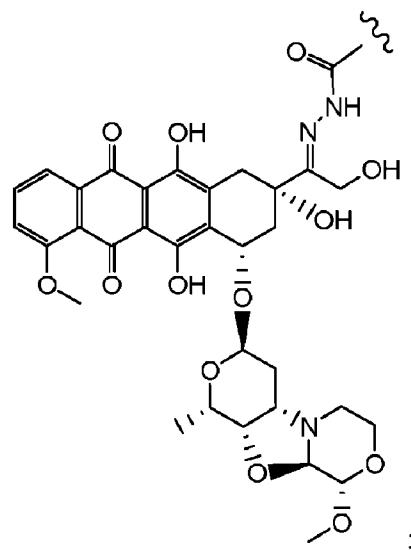


25

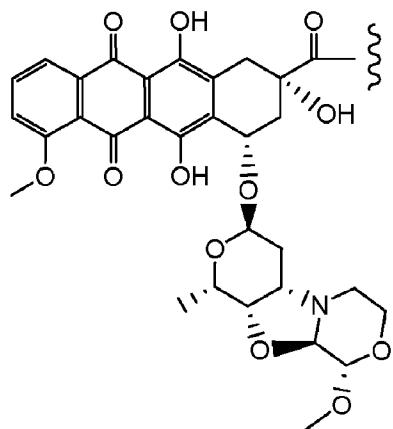
en el que n es 0 o 1.

En algunas realizaciones, D es un derivado de nemorubicina. En algunas realizaciones, D tiene una estructura seleccionada de:

30



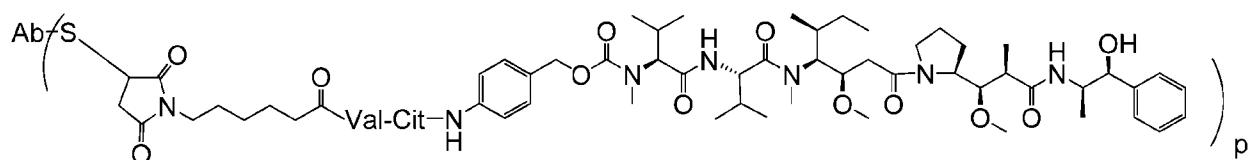
y



5

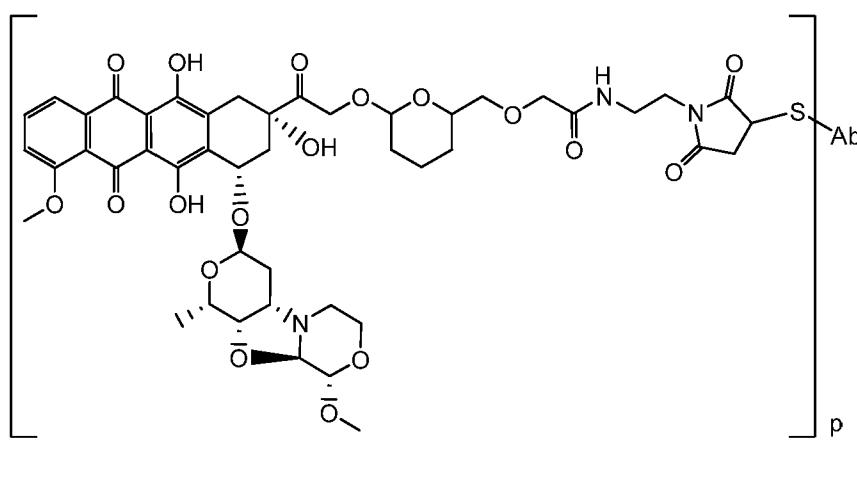
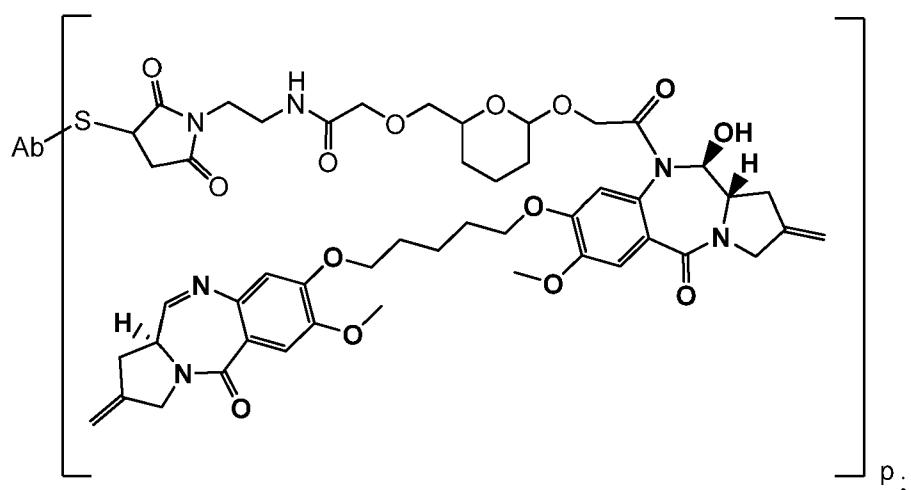
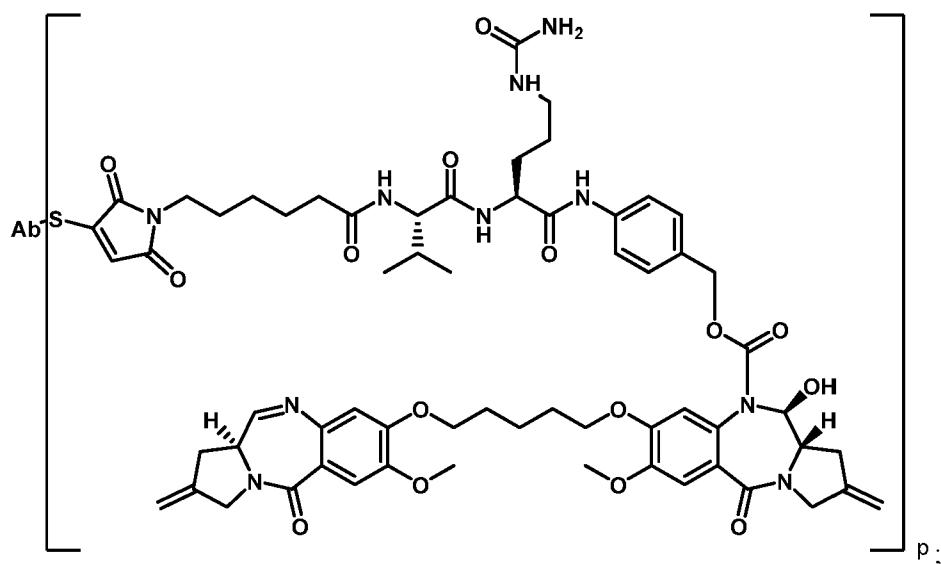
En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un conector que es escindible por una proteasa. En algunas realizaciones, el conector comprende un dipéptido val-cit o un dipéptido Phe-homoLys. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un conector que es lábil en ácido. En algunas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

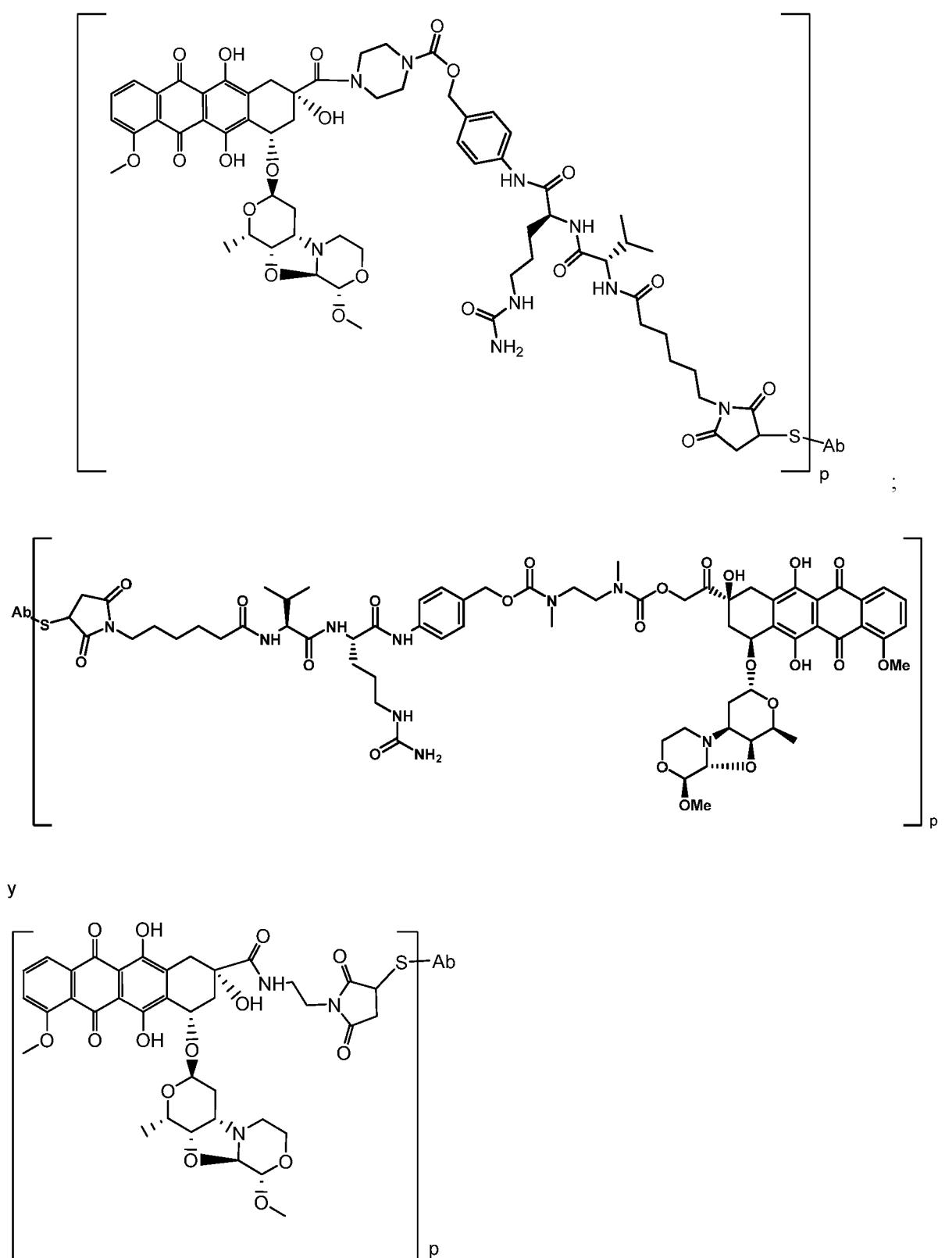
10 En algunas realizaciones, un inmunoconjugado tiene una fórmula seleccionada de:



15

en la que S es un átomo de azufre;





5

En algunas realizaciones, *p* oscila de 2-5.

10 En algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones tales, una formulación farmacéutica comprende un inmunoconjunto que comprende un anticuerpo que se une a FcRH5, por ejemplo, como se describe en el presente documento. El anticuerpo anti-FcRH5

se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

- 5 En algunas realizaciones, se proporcionan las formulaciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos de tratamiento de individuos que tienen cánceres FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c) como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones tales, un método comprende administrar una formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjungado que comprende un anticuerpo que se une a FcRH5 y/o un anticuerpo biespecífico contra FcRH5, por ejemplo, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico contra FcRH5 comprende un brazo de unión a FcRH5 y un brazo de unión a CD3. El anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En algunas realizaciones, el cáncer FcRH5-positiva es un trastorno proliferativo de linfocitos B. En algunas realizaciones, el cáncer FcRH5-positiva es neoplasia de células plasmáticas. En algunas realizaciones, la neoplasia de células plasmáticas es mieloma múltiple. En algunas realizaciones, un método comprende administrar un agente terapéutico adicional al individuo.

En algunas realizaciones, se proporcionan las formulaciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos de inhibición de la proliferación de una célula FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c) como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, comprendiendo el método exponer la célula a un inmunoconjungado que comprende un anticuerpo que se une a FcRH5 y/o un anticuerpo biespecífico contra FcRH5 en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a FcRH5 sobre la superficie de la célula. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico contra FcRH5 comprende un brazo de unión a FcRH5 y un brazo de unión a CD3. El anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FcRH5 es un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer FcRH5-positiva es un trastorno proliferativo de linfocitos B. En algunas realizaciones, el cáncer FcRH5-positiva es neoplasia de células plasmáticas. En algunas realizaciones, la neoplasia de células plasmáticas es mieloma múltiple. En algunas realizaciones, un método comprende administrar un agente terapéutico adicional al individuo.

Un anticuerpo que se une a FcRH5 puede conjugarse con una marca. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a FcRH5 es un anticuerpo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la marca es un emisor de positrones. En algunas realizaciones, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

Breve descripción de las figuras

- 40 La FIG. 1(A) representa las tres isoformas principales de FcRH5, FcRH5a (IRTA2a; identificador de UniProt Q96RD9-3), FcRH5b (IRTA2b; identificador de UniProt Q96RD9-4) y FcRH5c (IRTA2c; identificador de UniProt Q96RD9-1). Los dominios de tipo Ig están numerados y se corresponden con la secuencia de aminoácidos de identificador de UniProt Q69RD9-1 (SEQ ID NO: 1): dominio 1 de tipo Ig (aa ("aminoácido") 23-100), dominio 2 de tipo Ig (aa 105-185), dominio 3 de tipo Ig (aa 188-271), dominio 4 de tipo Ig (287-373), dominio 5 de tipo Ig (aa 380-466), dominio 6 de tipo Ig (aa 490-555), dominio 7 de tipo Ig (aa 568-652), dominio 8 de tipo Ig (aa 658-731) y dominio 9 de tipo Ig (aa 754-835). La FIG. 1(B) representa parte de FcRH5 (SEQ ID NO: 136) y la estructura y homología de los aminoácidos de FcRH5 735 a 977 de FcRH5c (SEQ ID NO: 2).
- 45 La FIG. 2 muestra la unión de anticuerpos contra FcRH5 a células SVT2 transfectadas con (A) FcRH5 humana y (B) FcRH5 de cíno, en diferentes concentraciones.
- 50 La FIG. 3 muestra la unión de anticuerpos contra FcRH5 a (A) células EJM o (B) células OPM2 transfectadas con FcRH5 humana, y la unión de sobrenadantes de subclones (C) 5A10.1, (D) 5F1.1, (E) 3G7.1 y (F) 6D2.2 a células MOLP2 que expresan FcRH5 endógenamente.
- 55 La FIG. 4 muestra (A) la unión de sobrenadantes de subclones de FcRH5 a células 293 transfectadas con FcRH5 WT o (B) mutante con delección de 4 dominios extracelulares proximales de la membrana.
- 60 La FIG. 5 muestra la unión de (A) los anticuerpos contra FcRH5 a FcRH5a por ELISA, y (B) la unión de sobrenadantes de subclones a linfocitos B humanos.
- 65 La FIG. 6 muestra la unión de sobrenadantes de subclones de FcRH5 a células SVT2 transfectadas con (A) FcRH1, (B) FcRH2, (C) FcRH3, o (D) FcRH4.
- La FIG. 7 muestra la unión de sobrenadantes de subclones de anticuerpos contra FcRH5 a linfocitos NK.
- La FIG. 8 muestra (A) la actividad de destrucción de bisFab contra FcRH5, FcRH5-TDB (clon 10A8) y (B) HER2-TDB y (C) la actividad de destrucción de FcRH5-bisFabs y (D) FcRH5-TDB en células 293 transfectadas con FcRH5.
- La FIG. 9 muestra (A) la actividad de destrucción y (B) la activación de linfocitos T de bisFabs contra FcRH5 y FcRH5-TDB en células MOLP-2.

Descripción detallada**I. Definiciones**

- 5 El término "FcRH5", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier FcRH5 madura nativa que resulta del procesamiento de una proteína precursora de FcRH5 en una célula. El término incluye FcRH5 de cualquier fuente de vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos y monos cinomolgos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término también incluye variantes que existen de forma natural de FcRH5, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes 10 alélicas. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las proteínas FcRH5 humanas es FcRH5a (IRTA2a; identificador de UniProt Q96RD9-3; 759 aa), FcRH5b (IRTA2b; identificador de UniProt Q96RD9-4; 592 aa), FcRH5c (IRTA2c; identificador de UniProt Q96RD9-1; 977 aa (SEQ ID NO: 1), identificador de UniProt Q96RD9-2 (124 aa) y/o FcRH5d (IRTA2d; identificador de UniProt Q96RD9-5; 152 aa).
- 15 El término "formas glucosiladas de FcRHS" se refiere a formas que existen de forma natural de FcRH5 que se modifican post-traduccionalmente mediante la adición de restos de hidrato de carbono.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar 20 sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros 25 apropiados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines en el presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de 30 secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el N.º de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para su uso en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los 35 parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene 40 o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo:

45 100 veces la fracción X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el 50 párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

55 Los términos "anticuerpo anti-FcRH5" y "un anticuerpo que se une a FcRH5" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a FcRH5 con afinidad suficiente de forma que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento de FcRH5. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-FcRH5 a una proteína no FcRH5 sin relacionar es inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a FcRH5 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a FcRH5 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 5 \text{nM}$, $\leq 4 \text{nM}$, $\leq 3 \text{nM}$, $\leq 2 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$ o $\leq 0,001 \text{nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-FcRH5 se une a un epítope de FcRH5 que está 60 conservado entre FcRH5 de diferentes especies. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

65 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la

actividad de unión al antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto y que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

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

Un "anticuerpo que se une al mismo epítope" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición el 50 % o más, y en cambio, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición el 50 % o más. Un ensayo de competición a modo de ejemplo se proporciona en el presente documento.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítope, excepto por posibles anticuerpos de variante, por ejemplo, que contienen mutaciones que existen de forma natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando tales variantes generalmente presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Así, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante varias técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fago y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de inmunoglobulina humana, siendo tales métodos y otros métodos a modo de ejemplo de preparación de anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

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

"Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que existen de forma natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. De extremo N a C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamado un dominio pesado variable o un dominio variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Similamente, de extremo N a C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamado un dominio ligero variable o un dominio variable de la cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

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

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos.

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

humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

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

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región del extremo C de una cadena pesada de la inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de variante. En una realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede o puede no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es según el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

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

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

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los restos de aminoácidos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., arriba. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., arriba.

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

Una "región estructural humana aceptora" para los fines en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define más adelante. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede

contener cambios de la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, la región estructural humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural humana de inmunoglobulina VL o secuencia de la región estructural consenso humana.

- 5 "Afinidad" se refiere a la intensidad de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento. Realizaciones ilustrativas específicas y a modo de ejemplo para medir afinidad de unión se describen a continuación.
- 10 15 Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee tales alteraciones, produciendo tales alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.
- 20 Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluyen, pero no se limitan a, un agente citotóxico.
- 25 30 El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o produce muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu); agentes quimioterapéuticos o fármacos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados más adelante.
- 35 40 "Funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); activación de linfocitos B.
- 45 50 Un "anticuerpo aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más del 95 % o 99 % de pureza, como se ha determinado por, por ejemplo, electroforéticas (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficas (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de métodos para la evaluación de la pureza del anticuerpo, véase, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr., B 848:79-87 (2007).
- 55 60 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.
- 65 70 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FcRH5" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras (o fragmentos de las mismas) del anticuerpo, que incluyen tal(es) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y tal(es) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula hospedadora.
- 75 80 El término "vector," como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como estructura de ácido nucleico auto-replicante, además del vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".
- 85 90 Los términos "célula hospedadora", "línea de células hospedadoras" y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, que incluyen la progenie de tales células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y progenie derivada de la misma sin considerar el número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, sino que puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en

la célula originalmente transformada está incluida en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratan" o "tratar") se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el ciclo natural del individuo que está tratándose, y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el ciclo de patología clínica. Efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular/proliferación no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer del intestino delgado, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Un "tumor maligno de linfocitos B" en el presente documento incluye linfoma no Hodgkin (LNH), que incluye LNH de escasa malignidad/folicular, LNH linfocítico pequeño (SL), LNH de malignidad intermedia/folicular, LNH difuso de malignidad intermedia, LNH inmunoblástico de gran malignidad, LNH linfoblastico de gran malignidad, LNH de células no escindidas pequeñas de gran malignidad, LNH con neoplasia maligna, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA y macroglobulinemia de Waldenström, linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin predominante en linfocitos (LPHD), linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia linfocítica crónica (LLC), LNH inactivo que incluye LNH inactivo recidivante y LNH inactivo resistente a rituximab; leucemia, que incluye leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica; linfoma de células del manto; y otros tumores malignos hematológicos. Tales tumores malignos pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra marcadores superficiales de linfocitos B, tales como FcRH5 (por ejemplo, FcRH5c). Tales enfermedades se contemplan en el presente documento para ser tratadas por la administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador superficial de linfocitos B, tal como FcRH5 (por ejemplo, FcRH5c), e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico como se desvela en el presente documento. Tales enfermedades también se contemplan en el presente documento para ser tratadas por terapia de combinación que incluye un anticuerpo anti-FcRH5 (incluyendo anticuerpo biespecífico contra FcRH5) o conjugado de anticuerpo anti-FcRH5 - fármaco en combinación con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie.

El término "linfoma no Hodgkin" o "LNH", como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer del sistema linfático distinto de linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin pueden generalmente distinguirse de los linfomas no Hodgkin por la presencia de células de Reed-Sternberg en linfomas de Hodgkin y la ausencia de dichas células en linfomas no Hodgkin. Ejemplos de linfomas no Hodgkin englobados por el término como se usa en el presente documento incluyen cualquiera que sería identificado como tal por un experto en la materia (por ejemplo, un oncólogo o patólogo) según los esquemas de clasificación conocidos en la técnica, tales como el esquema revisado europeo-americano de linfomas (REAL) como se describe en Color Atlas of Clinical Hematology (3^a edición), A. Victor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Véase, en particular, las listas en las FIGS. 11.57, 11.58 y 11.59. Más ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, LNH recidivante o resistente al tratamiento, LNH de escasa malignidad de primera línea, LNH de estadio III/IV, LNH resistente a quimioterapia, leucemia linfoblástica de precursores y/o linfoma, linfoma linfocítico pequeño, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma extranodal de la zona marginal-MALTA, linfoma nodal de la zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de escasa malignidad/folicular, LNH de malignidad intermedia/folicular, linfoma de células del manto, linfoma del centro del folículo (folicular), LNH difuso de malignidad intermedia, linfoma de linfocitos B grande difuso, LNH agresivo (incluyendo LNH agresivo de primera línea y LNH recidivante agresivo), LNH que recae después de o resistente a trasplante autólogo de células madres, linfoma primario mediastinal de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primaria, LNH inmunoblástico de gran malignidad, LNH linfoblastico de gran malignidad, LNH de células no escindidas pequeñas de gran malignidad, LNH con neoplasia maligna, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular grande de precursores (periférica), micosis fungoide y/o síndrome de Sézary, linfomas de la piel (cutáneos), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angiocéntrico.

Los trastornos de células plasmáticas resultan de la división o multiplicación no controlada de un clon de células plasmáticas. Las células plasmáticas surgen de los linfocitos B activados (es decir, linfocitos B). Cada linfocito B produce un receptor único, conocido como el receptor de linfocitos B, presentado sobre su superficie celular que es específico para una sustancia extraña, es decir, antígeno. Cuando un receptor de linfocitos B se une a su antígeno relacionado, la célula que expresa el receptor se activa para volver a entrar en el ciclo celular, produciendo muchas copias clonales de él mismo. Los clones maduran en células plasmáticas que residen principalmente en la médula ósea y que están especializados para producir copias del receptor de linfocitos B que son liberadas en la corriente sanguínea como anticuerpos. En un trastorno de células plasmáticas, la célula plasmática o el linfocito B parental sufre daño genético, que produce la supresión de o la insensibilidad a las limitaciones normales en la división celular y/o actividad. Células plasmáticas hijas derivadas de tales células son malignas porque pueden dividirse libremente y/o generar cantidad en exceso de la misma inmunoglobulina (anticuerpo). Frecuentemente, la inmunoglobulina producida es incompleta o tiene una conformación incorrecta que puede producir la acumulación de la proteína (también conocida como proteína monoclonal, proteína M, paraproteína o proteína de amiloide, dependiente del trastorno específico) en el suero, tejidos u órganos (especialmente los riñones), que conduce a disfunción y/o insuficiencia orgánica. Los trastornos de células plasmáticas incluyen gammapatías monoclonales de significancia indeterminada (MGUS), mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia, enfermedades de la cadena pesada y amiloidosis sistémica de la cadena ligera (AL), que se diferencian basándose en la naturaleza proliferativa del clon, el grado de participación de la médula ósea y el tipo de proteína M expresada. Trastornos de células plasmáticas adicionales son plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, plasmacitomas solitarios múltiples, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenström, linfomas no Hodgkin de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B.

El término "cáncer FcRH5-positiva" se refiere a un cáncer que comprende células que expresan FcRH5 sobre su superficie. Para los fines de determinar si una célula expresa FcRH5 sobre la superficie, se considera que la expresión de ARNm de FcRH5 se correlaciona con la expresión de FcRH5 en la superficie celular. En algunas realizaciones, la expresión de ARNm de FcRH5 se determina por un método seleccionado de hibridación *in situ* y RT-PCR (incluyendo RT-PCR cuantitativa). Alternativamente, la expresión de FcRH5 sobre la superficie celular puede determinarse, por ejemplo, usando anticuerpos contra FcRH5 en un método tal como inmunohistoquímica, FACS, etc. En algunas realizaciones, FcRH5 es uno o más de FcRH5a, FcRH5b, FcRH5c, identificador de UniProt Q96RD9-2 y/o FcRH5d. En algunas realizaciones, FcRH5 es FcRH5c.

El término "célula FcRH5-positiva" se refiere a una célula que expresa FcRH5 en su superficie. En algunas realizaciones, FcRH5 es uno o más de FcRH5a, FcRH5b, FcRH5c, identificador de UniProt Q96RD9-2, y/o FcRH5d. En algunas realizaciones, FcRH5 es FcRH5c.

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

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

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

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal como para permitir que la actividad biológica de un principio activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

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

"Alquilo" es hidrocarburo C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos son metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentil(-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentil(-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃). El término "alquilo C₁-C₈", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 8 átomos de carbono.

Grupos "alquilo C₁-C₈" representativos incluyen, pero no se limitan a, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, alquilos C₁-C₈ insaturados incluyen, pero no se limitan a, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo. Un grupo alquilo C₁-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' está seleccionado independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

El término "alquilo C₁-C₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Un grupo alquilo C₁-C₁₂ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' está seleccionado independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

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

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

"Alcoxi" es un grupo alquilo individualmente unido a un oxígeno. Grupos alcoxi a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, metoxi (-OCH₃) y etoxi (-OCH₂CH₃). Un "alcoxi C₁-C₅" es un grupo alcoxi con 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alcoxi pueden estar sin sustituir o sustituidos con uno o más grupos, como se ha descrito anteriormente para grupos alquilo.

"Alquenilo" es hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, sp². Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂). Un "alquenilo C₂-C₈" es un hidrocarburo que contiene 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, sp².

"Alquinilo" es hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono, sp. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH). Un "alquinilo C₂-C₈" es un hidrocarburo que contiene 2 a 8 átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono, sp.

"Alquileno" se refiere a un radical de hidrocarburo saturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico 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 diferentes átomos de carbono de un alcano parental. Radicales alquileno típicos incluyen, pero no se limitan a: metileno (-CH₂-) 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), y similares.

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

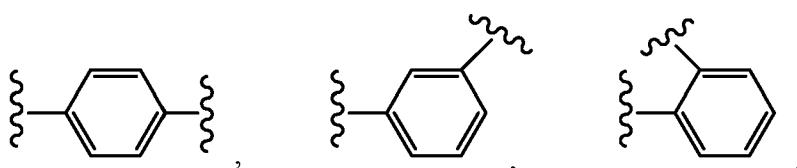
"Alquenileno" se refiere a un radical de hidrocarburo insaturado, de cadena ramificada o lineal o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros de radicales monovalentes derivados por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno parental. Radicales alquenileno típicos incluyen, pero no se limitan a: 1,2-etileno (-CH=CH-).

"Alquinileno" se refiere a un radical de hidrocarburo 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 parental. Radicales alquinileno típicos incluyen, pero no se limitan a: acetileno ($-C\equiv C-$), propargilo ($-CH_2C\equiv C-$) y 4-pentinilo ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv C-$).

- 5 "Arilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ - NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C_1-C_8 y arilo.

- 10 Un "arilo C_5-C_{20} " es un grupo arilo con 5 a 20 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Ejemplos de grupos arilo C_5-C_{20} incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo arilo C_5-C_{20} puede estar sustituido o sin sustituir como se ha descrito anteriormente para los grupos arilo. Un "arilo C_5-C_{14} " es un grupo arilo con 5 a 14 átomos de carbono en los anillos aromáticos carbocíclicos. Ejemplos de grupos arilo C_5-C_{14} incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo y antracenilo. Un grupo arilo C_5-C_{14} puede estar sustituido o sin sustituir como se ha descrito anteriormente para grupos arilo.

- 15 20 Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras:



- 25 en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ - NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C_1-C_8 y arilo.

- 30 35 "Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido con un radical arilo. Grupos arilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-il, 2-feniletan-1-il, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-il, 2-naftiletenil-1-il, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, que incluye grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo tiene 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene 5 a 14 átomos de carbono.

- 40 45 "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 , está sustituido con un radical heteroarilo. Grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, 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 tiene 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene 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 de anillo (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

- 50 55 "Alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo sustituido" significan alquilo, arilo y arilalquilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno independientemente sustituidos con un sustituyente. Sustituyentes típicos incluyen, pero no se limitan a, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂ en las que cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, alquilo C_2-C_{18} , arilo C_6-C_{20} , heterociclo C_3-C_{14} , grupo protector o resto de profármaco. Grupos alquieno, alquenieno y alquinieno como se han descrito anteriormente también pueden estar similarmente sustituidos.

- 60 65 "Heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos de anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende 3 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros de 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 de anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

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

Ejemplos de heterociclos incluyen a modo de ejemplo y no limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tdiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tianthrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxyxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxyazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoílo.

A modo de ejemplo y no limitación, heterociclos unidos por carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Todavía más normalmente, heterociclos unidos por carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

A modo de ejemplo y no limitación, heterociclos unidos por 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-carbolina. Todavía más normalmente, heterociclos unidos por carbono incluyen 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

Un "heterociclo C₃-C₈" se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo están independientemente sustituidos con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo, benzotifeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinalo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

"Heterociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está sustituido con un enlace. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta seis grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

Un "heterociclo C₃-C₂₀" se refiere a un carbociclo C₃-C₂₀ aromático o no aromático en el que uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo están independientemente sustituidos con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Un heterociclo C₃-C₂₀ puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en los que cada R' está seleccionado independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.

"Heterociclo C₃-C₂₀" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₂₀ definido anteriormente, en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está sustituido con un enlace.

"Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Carbociclos monocíclicos tienen 3 a 6 átomos de anillo, todavía más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Carbociclos bicíclicos tienen 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema de biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema de biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

- 5 Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbocíclico no aromático de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros saturado o insaturado. Carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero no se limitan a, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C₃-C₈ puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -ariilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en las que cada R' se selecciona independientemente de H, -alquilo C₁-C₈ y arilo.
- 10 10 Un "carbociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo está sustituido con un enlace.
- 15 15 "Conector" se refiere a un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones, los conectores incluyen un radical divalente tal como un alquildiilo, un arildiilo, un heteroarildiilo, restos tales como: -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, unidades de repetición de alquiloxy (por ejemplo, polietienoxi, PEG, polimetienoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietilenamino, Jeffamine™); y éster de diácido y amidas que incluyen succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida. En diversas realizaciones, los conectores pueden comprender uno o más restos de aminoácidos, tales como valina, fenilalanina, lisina y homolisina.
- 20 20 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del componente de la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre el componente de la imagen especular.
- 25 25 El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.
- 30 30 "Diaestereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diaestereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.
- 35 35 "Enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.
- 40 40 Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en este documento generalmente siguen S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eiel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano del plano-luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano-luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse en lo sucesivo un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se llama frecuentemente una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina en lo sucesivo una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse cuando no ha habido estereoselección o estereo especificidad en una reacción química o proceso. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.
- 45 45 50 "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Ciertos grupos salientes son muy conocidos en la técnica, y ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.
- 55 55 El término "grupo protector" se refiere a un sustituyente que es comúnmente empleado para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras que reaccionan otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad de amino en el compuesto. Grupos protectores de amino adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991, o una edición posterior.
- 60 60 65 Como es entendido por un experto en la materia, referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo,

descripción con referencia a "aproximadamente X" incluye descripción de "X".

Se entiende que el aspecto y realizaciones descritas en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones. Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias al plural, a menos que se indique lo contrario.

5

II. Composiciones y métodos

En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas según se definen en las reivindicaciones que comprenden anticuerpos que se unen a FcRH5 que incluyen anticuerpos biespecíficos e inmunoconjungados que comprenden tales anticuerpos. Los anticuerpos e inmunoconjungados pueden ser útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de cánceres FcRH5-positiva. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunos casos, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

15 Sin desear quedar ligado a teoría, la selección del antígeno preciso para los anticuerpos de la presente invención fue conducida por al menos tres consideraciones importantes. Primero, hubo una necesidad de poca a ninguna reactividad cruzada con isoformas de FcRH5 distintas de FcRH5c, tales como la isoforma a e isoforma b, para evitar que el terapéutico resultante se uniera a moléculas no diana y así redujera su eficacia. Como se ilustra en la Figura 1, el dominio 9 de FcRH5 es un ejemplo de una secuencia única entre las tres isoformas. A continuación, hubo una necesidad de poca a ninguna reactividad cruzada con miembros de la familia de FcRH distintos de FcRH5, tales como FcRH1, FcRH2, FcRH3 y FcRH4. Esto es difícil debido a la naturaleza generalmente altamente conservada de los últimos dominios de tipo Ig en muchos de los miembros de la familia de FcRH. Pero debido a la necesidad en paralelo de la especificidad de la isoforma c de FcRH5, se buscó un anticuerpo que se uniera al último dominio de tipo Ig. Finalmente, para anticuerpos que van a usarse en moléculas terapéuticas que funcionan para poner grandes estructuras en estrecha proximidad, tales como linfocitos T y células tumorales usando un formato de anticuerpo biespecífico, se sabe que epítopes de tumor más próximos a la membrana celular son más eficaces (véase, por ejemplo, Bluemel et al., *Cancer Immunol Immunother.* (2010) 59:1197 1209). Algunas veces descrita como la teoría de segregación cinética, la localización proximal de membrana celular del dominio 9 de FcRH5 es una diana de antígeno deseable en este contexto. Para cumplir estas consideraciones y como se describe en detalle más adelante, se desarrollaron ciertas realizaciones de los anticuerpos de la presente invención.

En el presente documento se describen anticuerpos anti-FcRH5 aislados que se unen a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende el dominio 9 de tipo Ig. En algunos casos, el dominio 9 de tipo Ig también se llama 8 de tipo c de tipo Ig. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 754-835 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 752-834 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 743-850 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 745-851 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos de aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 40 11, 12, 13, 14 o 15 del límite del extremo N y/o extremo C. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos de aproximadamente cualquiera de 750, 751, 752, 753 o 754 a aproximadamente cualquiera de 830, 831, 832, 833, 834, 835 u 836 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, los anticuerpos se unen a FcRH5c y/o la región específica de isoforma c con una afinidad de ≤ 5 nM, o ≤ 4 nM, o ≤ 3 nM, o ≤ 2 nM, o ≤ 1 nM, y opcionalmente ≥ 0,0001 nM, o ≥ 0,001 nM, o ≥ 0,01 nM.

45

En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo tiene una o más de las siguientes características: a) reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa (es decir, se une a FcRH5 humana de longitud completa y se une a FcRH5 de cinco de longitud completa), b) no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4 (es decir, no se une significativamente a FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4), c) se une a FcRH5 endógena, d) no reacciona de forma cruzada con FcRH5a (es decir, no se une significativamente a FcRH5a), y e) no reacciona de forma cruzada con otro dominio de tipo Ig de FcRH5 (es decir, no se une significativamente a otro dominio de tipo Ig de FcRH5). Métodos de determinación de la capacidad de unión son conocidos en la técnica y se describen más adelante.

55

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 110. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 111 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 110. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 1C8.1. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 1C8.1. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En el presente documento, se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 113 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 112. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 135 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 134. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 1G7.2. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 1G7.2. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 1G7.2'. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 1G7.2'. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH5a.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 115 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 114. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 2H7.3. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 2H7.3. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y HVR-L3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %,

5 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 117 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 116.

10 En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 3A4.2. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3A4.2. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1,

15 FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En el presente documento, y en algunos casos, se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90; y/o b)

20 una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos

25 aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

30 de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 119 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 118. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 3B12.1.1. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3B12.1.1. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos

35 casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH5a.

40 En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,

45 HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %,

50 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 121 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 120. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis

55 HVR de 3C10. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3C10. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

60 En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,

HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 123 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 122. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 3F10. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3F10. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH5a.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 125 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 125 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 124. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVRS de 3G3. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3G3. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH5a.

En el presente documento, y en algunos casos, se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 126. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 127 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 126. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 3G7.1.5. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 3G7.1.5. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 129 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 129 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 128. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 5A10.1.3. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 5A10.1.3. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende a HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 131 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 130. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 5F1.1.5. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 5F1.1.5. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH5a.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden a) una cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97; y/o b) una cadena ligera que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. En algunos casos, la cadena pesada que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 y HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y/o una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132. En algunos casos, el anticuerpo comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 133 y/o una secuencia VL de SEQ ID NO: 132. En algunos casos de cualquiera de los anticuerpos, el anticuerpo comprende seis HVR de 6D2. En algunos casos, el anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL de 6D2. En algunos casos, el anticuerpo se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c (por ejemplo, el dominio 9 de tipo Ig). En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa. En algunos casos, el anticuerpo no reacciona significativamente de forma cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos casos, el anticuerpo se une a FcRH5 endógena. En algunos casos, el anticuerpo se une a linfocitos B. En algunos casos, el anticuerpo no se une significativamente a linfocitos NK y/o monocitos.

En un aspecto adicional proporcionado en el presente documento, un anti-FcRH5 anterior es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo químérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-FcRH5 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerdo, o un fragmento F(ab')₂. En otro caso, el anticuerpo es un anticuerpo sustancialmente de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 u

otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti-FcRH5 proporcionado en el presente documento. En ciertos casos, se proporciona un anticuerpo que se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c a partir de, dentro de, o solapando los aminoácidos 754-835 de SEQ ID NO: 1.

El anticuerpo contra FcRH5, particularmente uno biespecífico contra FcRH5 (por ejemplo, biespecífico anti-CD3/anti-FcRH5), puede tener características, individualmente o en combinación, basándose en ensayos de la línea celular HEK (células HEK reconstituidas con componentes de señalización necesarios para el desencadenamiento de TCR como se describe en James y Valle, *Nature* 487:64-69 (2012). En algunos casos, las características, individualmente o en combinación, pueden incluir interfase de células tumorales / sinapsis inmunológicas, fosforilación de TCR mediada por Lck, actividad de ZAP70 que incluye estado de fosforilación y localización, actividad de CD58 que incluye localización y unión, actividad de β_2 Ar que incluye localización y unión, actividad de CAAx que incluye localización y unión, actividad de CD45 que incluye localización, actividad de pMHC que incluye localización, y/o actividad de TCR y características de desencadenamiento.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-FcRH5 puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describe en (a)-(e) y/o las Secciones 1-7 a continuación.

20 (a) se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c

Se conocen en la técnica métodos de determinación de si un anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunos casos, la unión de un anticuerpo anti-FcRH5 a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c puede determinarse expresando polipéptidos FcRH5 con delecciones del extremo N y C en células 293 y/o células SVT2 y probando por FACS como se describe en los ejemplos la unión del anticuerpo a los polipéptidos truncados. En algunos casos, una reducción sustancial ($\geq 70\%$ de reducción) o eliminación de la unión del anticuerpo a un polipéptido truncado con respecto a la unión a FcRH5 de longitud completa expresada en células 293 indica que el anticuerpo no se une a ese polipéptido truncado.

En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende el dominio 9 de tipo Ig. En algunos casos, el dominio 9 de tipo Ig también se llama 8 de tipo C2 de tipo Ig. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 754-835 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 752-834 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 743-850 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos 745-851 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos de aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 del límite del extremo N y/o extremo C. En algunos casos, la región específica de isoforma c comprende los aminoácidos de aproximadamente cualquiera de 750, 751, 752, 753 o 754 a aproximadamente cualquiera de 830, 831, 832, 833, 834, 835 u 836 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, FcH5 es FcRH5 humana. En algunos casos, FcRH5 es FcRH5 humana o FcRH5 de mono cinomolgo.

45 (b) reacciona de forma cruzada con (se une a) FcRH5 humana y de cino con una afinidad de $\leq 5\text{ nM}$, o $\leq 4\text{ nM}$, o $\leq 3\text{ nM}$, o $\leq 2\text{ nM}$, o $\leq 1\text{ nM}$, y opcionalmente $\geq 0,0001\text{ nM}$, o $\geq 0,001\text{ nM}$, o $\geq 0,01\text{ nM}$

Se conocen en la técnica métodos de determinación de la afinidad de unión. En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse según un ensayo BiAcore®, ELISA, FACS e IHC, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

50 En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH35 humana y/o de cino con una afinidad de aproximadamente cualquiera de $\leq 5\text{ nM}$, o $\leq 4\text{ nM}$, o $\leq 3\text{ nM}$, o $\leq 2\text{ nM}$, o $\leq 1\text{ nM}$. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5 humana y/o de cino con una afinidad de aproximadamente ≤ 5 . En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5 humana y/o de cino con una afinidad de aproximadamente $\leq 4\text{ nM}$. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5 humana y/o de cino con una afinidad de aproximadamente $\leq 3\text{ nM}$. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5 humana y/o de cino con una afinidad de aproximadamente $\leq 2\text{ nM}$. En algunos casos, FcRH5 es FcRH5 humana. En algunos casos, FcRH5 es FcRH5 de mono cinomolgo.

60 (c) no reacciona de forma cruzada con (no se une a) FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4

Se conocen en la técnica métodos de determinación de la unión. En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse según un ensayo BiAcore®, FACS, ELISA e IHC, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

65 En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5 con una afinidad superior a aproximadamente cualquiera de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces superior a FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4. En algunos

casos, FcRH es FcRH humana.

(d) no reacciona de forma cruzada con (no se une a) FcRH5a

- 5 Se conocen en la técnica métodos de determinación de la unión. En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse según un ensayo BiAcore®, FACS, ELISA e IHC, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

10 En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a FcRH5c con una afinidad superior a aproximadamente cualquiera de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces superior a FcRH5a. En algunos casos, FcRH es FcRH humana.

(e) no reacciona de forma cruzada con otro dominio de tipo Ig (no se une a) de FcRH5

15 Se conocen en la técnica métodos de determinación de la unión. En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse según un ensayo BiAcore®, FACS, ELISA e IHC, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

20 En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5 con una afinidad superior a aproximadamente cualquiera de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces superior al dominio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y/u 8 de tipo Ig de FcRH5. En algunos casos, FcRH es FcRH humana. En algunos casos, el dominio de tipo Ig es el dominio 1 de tipo Ig (aa 23-100 de SEQ ID NO: 1), dominio 2 de tipo Ig (aa 105-185 de SEQ ID NO: 1), dominio 3 de tipo Ig (aa 188-271 de SEQ ID NO: 1), dominio 4 de tipo Ig (287-373 de SEQ ID NO: 1), dominio 5 de tipo Ig (aa 380-466 de SEQ ID NO: 1), dominio 6 de tipo Ig (aa 490-555 de SEQ ID NO: 1), dominio 7 de tipo Ig (aa 568-652 de SEQ ID NO: 1), dominio 8 de tipo Ig (aa 658-731 de SEQ ID NO: 1).

25 *Ensayos de unión y otros ensayos*

30 En un aspecto, se prueba un anticuerpo anti-FcRH5 para su actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertos casos, se prueba un anticuerpo anti-FcRH5 para su capacidad para unirse a FcRH5 expresada sobre la superficie de una célula. Puede usarse un ensayo FACS para tal prueba.

35 En un ensayo de competición a modo de ejemplo, se incuba FcRH5 inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a FcRH5 y un segundo anticuerpo no marcado que está siendo probado para su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse a FcRH5. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba FcRH5 inmovilizada 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 sin unir, y se mide la cantidad de marca asociada a FcRH5 inmovilizada. Si la cantidad de marca asociada a FcRH5 inmovilizada está sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para unirse a FcRH5. En ciertos casos, FcRH5 inmovilizada está presente sobre la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa FcRH5 sobre su superficie.

40 En un aspecto, anticuerpos anti-FcRH5 purificados pueden ser adicionalmente caracterizados por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con exclusión por tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína. En un caso, se contempla un anticuerpo alterado que posee algunas de, pero no todas, las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertos casos, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para garantizar que solo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión de FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero retiene la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de la unión y eliminación/semivida *in vivo* de FcRn usando métodos conocidos en la técnica.

1. Afinidad del anticuerpo

Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede tener una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{nM}$, $< 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$, o $\leq 0,001 \text{nM}$, y opcionalmente es $\geq 10^{-13} \text{ M}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En algunos casos, K_d puede medirse por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de valoración de antígeno sin marcar, luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer condiciones para el ensayo, pueden recubrirse placas multipicillo MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente bloquearse con 2 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N.º 269620), se mezclan [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones sucesivas de un Fab de interés (por ejemplo, de acuerdo con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba entonces durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. A partir de aquí, las mezclas pueden transferirse a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución puede entonces ser eliminada y la placa lavada ocho veces con 0,1 % de polisorbato 20 (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, pueden añadirse 150 μl /picillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas pueden contarse en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Puede elegirse concentraciones de cada Fab que dan menos o igual al 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

K_d se puede medir también usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando BIACORE® -2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, pueden activarse chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno puede diluirse con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, puede inyectarse etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para mediciones cinéticas, pueden inyectarse diluciones sucesivas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pueden calcularse velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) puede calcularse como la relación k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma de Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

2. Fragmentos de anticuerpos

Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un fragmento de anticuerpo. Fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos más adelante. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE.UU. N.º 5.571.894 y 5.587.458. Para discusión de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítope de unión al receptor de rescate y que tienen elevada semivida *in vivo*, véase la patente de EE.UU. N.º 5.869.046.

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

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

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpos por diversas técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, además de producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

- 5 **3. Anticuerpos químéricos y humanizados**
- 10 Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo químérico. Se describen ciertos anticuerpos químéricos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo químérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo químérico es un anticuerpo de "cambio de clase" en el que la clase o subclase ha sido cambiada de la del anticuerpo parental. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.
- 15 Un anticuerpo químérico puede ser un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a los seres humanos, mientras que retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que HVR, por ejemplo, CDR (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. Algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado pueden estar sustituidos con restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los restos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad del anticuerpo o afinidad.
- 20 Anticuerpos humanizados y métodos de su preparación se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); patentes de EE.UU. N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmire et al., Methods 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (que describe "acondicionamiento superficial"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (que describe "barajado de FR"); y Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) y Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).
- 25 Regiones estructurales humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el método de "ajuste óptimo" (véase, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones ligeras o variables de la cadena pesada (véase, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); y Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci., 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).
- 35 **4. Anticuerpos humanos**
- 40 Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).
- 45 Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a exposición antigénica. Tales animales normalmente contienen todos o una porción de los loci de inmunoglobulina humana, que sustituyen los loci de inmunoglobulina endógena, o que están presentes extracromosómicamente o integrados al azar en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena han sido generalmente inactivados. Para una revisión de métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véanse, por tanto, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE.UU. N.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de EE.UU. N.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden ser adicionalmente modificadas, por ejemplo, combinando con una región constante humana diferente.
- 50 También pueden prepararse anticuerpos humanos por métodos basados en hibridomas. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales

humanos (véanse, por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)). También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridomas de linfocitos B humanos en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humana monoclonales de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyxue, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

5 También pueden generarse anticuerpos humanos aislando secuencias del dominio variable de clones de Fv seleccionados de bibliotecas de presentación en fagos derivados de humano. Tales secuencias del dominio variable pueden entonces combinarse con un dominio constante humano deseado. Técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

10 15 **5. Anticuerpos derivados de biblioteca**

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

30 En ciertos métodos de presentación en fagos, se clonian por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que pueden entonces cribarse para fago que se une a antígeno como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). El fago normalmente presenta fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de una sola cadena (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad por el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio intacto puede clonarse (por ejemplo, de humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos a un amplio intervalo de no-auto y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse sintéticamente bibliotecas intactas clonando segmentos de genes V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencia al azar para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para realizar el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Publicaciones de patente que describen las bibliotecas de fagos de anticuerpo humano incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU.: N.º 5.750.373, y las publicaciones de patente N.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

45 Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

50 **6. Anticuerpos multiespecíficos**

55 Un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En ciertos casos, una de las especificidades de unión es por FcRH5 y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertos casos, una de las especificidades de unión es por FcRH5 y la otra es por CD3. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.821.337. En ciertos casos, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopes diferentes de FcRH5. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan FcRH5. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

60 En algunas realizaciones, los anticuerpos contra FcRH5 son anticuerpos biespecíficos contra FcRH5. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes de una proteína FcRH5 como se describe en el presente documento. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión de FcRH5 con un sitio de unión por otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-FcRH5 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que centren y localicen los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa FcRH5. También pueden

usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan FcRH5. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a FcRH5- α y un brazo que se une el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, alcaloide de la vinca anti-interferón α , cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico contra FcRH5 comprende un primer brazo, en las que el primer brazo se une a FcRH5 y un segundo brazo, en las que el segundo brazo se une a Fc. El segundo brazo del anticuerpo biespecífico contra FcRH5 puede ser cualquier anticuerpo anti-Fc conocido en la técnica. Por ejemplo, el documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la patente de EE.UU. N.º 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. Un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα se muestra en el documento WO98/02463. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunos casos, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico contra FcRH5 comprende un primer brazo, en las que el primer brazo se une a FcRH5 y un segundo brazo, en las que el segundo brazo se une a CD3. El segundo brazo del anticuerpo biespecífico contra FcRH5 puede ser cualquier anticuerpo anti-CD3 conocido en la técnica. Las patentes de EE.UU. N.º 5.821.337 y 6.407.213 enseñan anticuerpos biespecíficos anti-ErbB2/anti-CD3. Se han descrito anticuerpos biespecíficos adicionales que se unen al epítope en el antígeno CD3 y un segundo epítope. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.078.998 (anti-CD3/antígeno de células tumorales); la patente de EE.UU. N.º 5.601.819 (anti-CD3/IL-2R; anti-CD3/CD28; anti-CD3/CD45); la patente de EE.UU. N.º 6.129.914 (anti-CD3/antígeno de linfocitos B maligno); la patente de EE.UU. N.º 7.112.324 (anti-CD3/CD19); la patente de EE.UU. N.º 6.723.538 (anti-CD3/CCRS); la patente de EE.UU. N.º 7.235.641 (anti-CD3/EpcAM); la patente de EE.UU. N.º 7.262.276 (anti-CD3/antígeno de tumor de ovario); y la patente de EE.UU. N.º 5.731.168 (anti-CD3/CD4IgG), el anticuerpo anti-CD3 del segundo brazo es un anticuerpo descrito en una cualquiera de los documentos WO 2005/118635, WO2007/042261, WO2008/119567, US5929212, US6750325, US6491916, US7994289, US7993641, US6706265, US5585097, US5968509, US5932448, US6129914, US7381803, US5834597 y US7862813. En algunos casos, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de la isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunos casos, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

Técnicas de preparación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, co-expresión recombinante de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de la inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829, y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), e ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos manipulando los efectos de orientación por interacción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de anticuerpo Fc (documento WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.676.980, y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelnik et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de una sola cadena (sFv) (véase, por ejemplo Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

También están incluidos en el presente documento anticuerpos manipulados con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a FcRH5, además de a otro antígeno diferente (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0069820).

Según un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_{H2} y C_{H3}. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C_{H1}) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produce altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de la

inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseada, ya que la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210(1986).

Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3}. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo que reemplazan las cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Los anticuerpos biespecíficos producidos según este enfoque se denominan en el presente documento anticuerpos "protuberancia en cavidad".

Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario diana a células no deseadas (patente de EE.UU. N.º 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica, y se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos son proteolíticamente escindidos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditióles vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en Fab'-tiol mediante 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 pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Fragmentos Fab'-SH de *E. coli* pueden ser directamente recuperados y químicamente acoplados para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado 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 unirse a células que expresan en exceso el receptor de ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano.

También se han descrito diversas técnicas de preparación y aislamiento de fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelnik et al., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron 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 re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para la preparación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden VH conectado a VL por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos usando dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

8. Variantes de anticuerpo

En ciertas realizaciones se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados

en el presente documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión al antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y delección

En ciertas realizaciones se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen HVR y FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones a modo de ejemplo", y como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo, retenerse/mejorarse la unión al antígeno, disminuir la inmunogenicidad, o mejorar la ADCC o CDC.

Tabla 1

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

Los aminoácidos pueden agruparse según propiedades comunes de la cadena lateral:

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

- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 5 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

10 Un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, elevada afinidad, reducida inmunogenicidad) con respecto al anticuerpo parental y/o habrán retenido sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo parental. Una variante sustitucional a modo de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en expresión en fagos tales como aquellas descritas en el presente documento. Brevemente, se mutan uno o más restos de HVR y los anticuerpos de variante se expresan en fago y se criban para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

20 Pueden hacerse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden hacerse en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que se someten a mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), siendo VH o VL de variante resultante probado para afinidad de unión. La maduración por afinidad construyendo y re-seleccionando bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al., en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Humana Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de varios métodos (por ejemplo, PCR propensa a error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Entonces se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca se criba entonces para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos cada vez). Los restos de HVR que participan en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelado. CDR-H3 y CDR-L3 en particular son frecuentemente elegidos como diana.

35 En ciertas realizaciones pueden producirse sustituciones, inserciones o delecciones dentro de una o más HVR, mientras que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en HVR. Tales alteraciones pueden estar fuera de "puntos calientes" de HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias de VH y de VL de variante proporcionadas anteriormente, cada HVR tanto está sin alterar como contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

40 Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de un anticuerpo que pueden ser elegidas como diana para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si se afecta la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, se usa una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos pueden ser elegidos como diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

50 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, además de inserciones secuencia dentro de la secuencia de un único resto de aminoácido o de múltiples restos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glucosilación

60 En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es alterado para aumentar o disminuir el grado al que el anticuerpo está glucosilado. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede ser convenientemente realizada alterando la secuencia de aminoácidos de forma que se creen o eliminan uno o más sitios de glucosilación.

65 Donde el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el hidrato de carbono unido a la misma. Anticuerpos

nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido biantenario ramificado que generalmente se une por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, además de una fucosa unida a GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas realizaciones, puede prepararse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo proporcionado en el presente documento con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

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

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

c) Variantes de la región Fc

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

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas de, pero no todas, las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión de FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero retiene la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. et al., Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSp) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de

interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión de C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de la unión y eliminación/semivida *in vivo* de FcRn usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)).

Anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE.UU. N.º 6.737.056). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (patente de EE.UU. N.º 7.332.581).

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

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

En algunas realizaciones, se hacen alteraciones en la región Fc que producen unión alterada (es decir, o bien mejorada o reducida) a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.194.551, documento WO 99/51642, e Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

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

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

40 d) Variantes de anticuerpo manipuladas con cisteína

En ciertas realizaciones, puede desearse crear anticuerpos manipulados con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo están sustituidos con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos restos con cisteína, grupos tiol reactivos se posicionan así en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunocomjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos puede estar sustituido con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos manipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar), y dextrano o poli(*n*-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico), y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si están unidos más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las

propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

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

10 B. Métodos recombinantes y composiciones

Pueden producirse anticuerpos usando métodos recombinantes y composiciones, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567. En una realización se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-FcRH5 descrito en el presente documento. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En otra realización se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden tal ácido nucleico. En otra realización se proporciona una célula hospedadora que comprende tal ácido nucleico. En una realización tal, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, ha sido transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización se proporciona un método de preparación de anticuerpo anti-FcRH5, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-FcRH5, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesitan glucosilación y función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523 (véase también Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente. Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, que incluyen hongos y cepas de levadura cuyas vías de glucosilación han sido "humanizadas", produciendo la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcialmente o completamente humano. Véanse Germgross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), y Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden usarse conjuntamente con las células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También puede utilizarse cultivos de células de planta como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describen, por ejemplo, en Graham et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de rata (MMT 060562); células TRI, como se describen, por ejemplo, en Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-

68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO DHFR⁻ (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-FcRH5 proporcionados en el presente documento pueden identificarse, cribarse o caracterizarse para sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede probarse para su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, BIACore®, FACS o transferencia Western.

En otro aspecto, pueden usarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento para unirse a FcRH5. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de competición tal se une al mismo epítope (por ejemplo, un epítope lineal o uno conformacional) que es unido por un anticuerpo descrito en el presente documento. Métodos detallados a modo de ejemplo para el mapeo de un epítope con el que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición a modo de ejemplo, FcRH5 inmovilizada se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a FcRH5 (por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento) y un segundo anticuerpo sin marcar que está siendo probado para su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse a FcRH5. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, FcRH5 inmovilizada se incuba en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a FcRH5, el exceso de anticuerpo sin unir se elimina, y se mide la cantidad de marca asociada a FcRH5 inmovilizada. Si la cantidad de marca asociada a FcRH5 inmovilizada es sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para unirse a FcRH5. Véase Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En algunas realizaciones, el FcRH5 es FcRH5c. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

D. Inmunoconjungados

En el presente documento también se proporcionan inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo anti-FcRH5 en el presente documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteína, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos (es decir, un radioconjungado). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

Los inmunoconjungados permiten la administración elegida como diana de un resto de fármaco a un tumor, y, en algunas realizaciones la acumulación intracelular en su interior, donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad a las células normales (Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387).

Los conjungados de anticuerpo-fármaco (ADC) son moléculas quimioterapéuticas dirigidas que combinan propiedades de tanto los anticuerpos como los fármacos citotóxicos dirigiendo potentes fármacos citotóxicos a células tumorales que expresan el antígeno (Teicher, B.A., (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004), potenciando así el índice terapéutico maximizando la eficacia y minimizando la toxicidad inespecífica (Carter, P.J. y Senter P.D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107).

Los compuestos ADC proporcionados en el presente documento incluyen aquellos con actividad antineoplásica. En algunas realizaciones, los compuestos ADC incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido covalentemente, al resto de fármaco. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une covalentemente al resto de fármaco mediante un conector. Los conjungados de anticuerpo-fármaco (ADC) proporcionados en el presente documento administran selectivamente una dosis eficaz de un fármaco a tejido tumoral por lo que puede lograrse mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja, mientras que se aumenta el índice terapéutico ("ventana terapéutica").

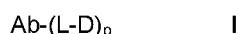
El resto de fármaco (D) de los conjungados de anticuerpo-fármaco (ADC) puede incluir cualquier compuesto, resto o

grupo que tenga un efecto citotóxico o citostático. Los restos de fármaco pueden conferir sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, unión a tubulina, unión a ADN o intercalación, e inhibición de ARN polimerasa, síntesis de proteínas y/o topoisomerasa. Restos de fármaco a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un maitansinoide, dolastatina, auristatina, caliqueamicina, pirrolobenzodiazepina (PBD), nemorubicina y sus derivados, PNU-159682, antraciclina, duocarmicina, alcaloide de la vinca, taxano, tricoteceno, CC1065, camptotecina, elinafida, y estereoisómeros, isósteros, análogos, y derivados de los mismos que tienen actividad citotóxica. Ejemplos no limitantes de tales inmunoconjungados se tratan en más detalle más adelante.

10 **1. Conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo**

Una realización a modo de ejemplo de un compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab) que se dirige a una célula tumoral, un resto de fármaco (D) y un resto de conector (L) que une Ab a D. En algunas realizaciones, el anticuerpo está unido al resto de conector (L) mediante uno o más restos de aminoácidos, tales como lisina y/o cisteína.

Un ADC a modo de ejemplo tiene la fórmula I:



20 donde p es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, el número de restos de fármaco que puede conjugarse con un anticuerpo está limitado por el número de restos de cisteína libres. En algunas realizaciones, se introducen restos de cisteína libres en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo por los métodos descritos en el presente documento. ADC a modo de ejemplo de fórmula I incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que tienen 1, 25 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína manipulados (Lyon, R. et al. (2012) Methods in Enzym., 502:123-138). En algunas realizaciones, uno o más restos de cisteína libres ya están presentes en un anticuerpo, sin el uso de ingeniería, en cuyo caso los restos de cisteína libres existentes pueden usarse para conjugar el anticuerpo con un fármaco. En algunas realizaciones, un anticuerpo se expone a condiciones reductoras antes de la conjugación del anticuerpo con el fin de generar uno o más restos de cisteína libres. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a 30 una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

a) Conectores a modo de ejemplo

35 Un "conector" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que puede usarse para unir uno o más restos de fármaco (D) a un anticuerpo (Ab) para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de fórmula I. En algunas realizaciones, los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) pueden prepararse usando un conector que tiene funcionalidades reactivas para la unión covalente al fármaco y al anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional reactivo de un conector o un 40 producto intermedio de fármaco-conector para preparar un ADC.

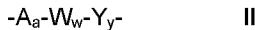
En un aspecto, un conector tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con una cisteína libre presente en 45 un anticuerpo para formar un enlace covalente. Tales funcionalidades reactivas a modo de ejemplo no limitante incluyen maleimida, haloacetamidas, α-haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres 4-nitrofenílicos, ésteres pentafluorofenílicos, ésteres tetrafluorofenílicos, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Véase, por ejemplo, el método de conjugación en la página 766 de Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, y los ejemplos en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, un conector tiene una funcionalidad que es capaz de reaccionar con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Tales grupos electrófilos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, grupos carbonilo de aldehído y cetona. En algunas realizaciones, un heteroátomo de la funcionalidad reactiva del conector puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Tales funcionalidades reactivas a modo de ejemplo no limitante incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida.

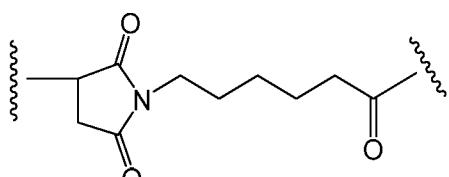
55 Un conector puede comprender uno o más componentes de conector. Componentes de conector a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo (un "PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato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

60 Un conector puede ser un "conector escindible", que facilita la liberación de un fármaco. Conectores escindibles a modo de ejemplo no limitante incluyen conectores lábiles en ácido (por ejemplo, que comprenden hidrazona), conectores sensibles a proteasas (por ejemplo, sensibles a peptidasa), conectores fotolábiles o conectores que contienen disulfuro (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); documento US 5208020).

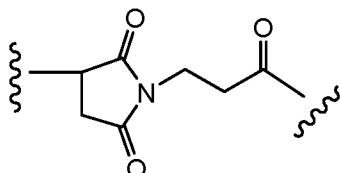
En ciertas realizaciones, un conector tiene la siguiente fórmula II:



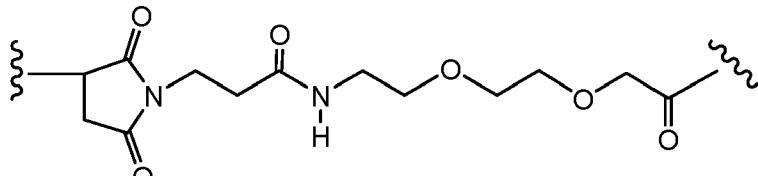
- 5 en la que A es una "unidad extensora", y a es un número entero de 0 a 1; W es una "unidad de aminoácido", y w es un número entero de 0 a 12; Y es una "unidad de espaciador", y es 0, 1 o 2. Un ADC que comprende el conector de fórmula II tiene la fórmula I(A): Ab-(A_a-W_w-Y_y-D)p, en la que Ab, D y p se definen como antes para la fórmula I. Realizaciones a modo de ejemplo de tales conectores se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.498.298.
- 10 En algunas realizaciones, un componente de conector comprende una "unidad extensora" (A) que une un anticuerpo con otro componente de conector o con un resto de fármaco. Unidades extensoras a modo de ejemplo no limitante se muestran a continuación (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo, fármaco, o componentes de conector adicionales):



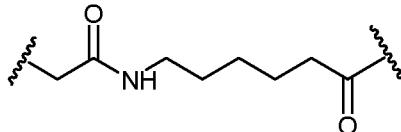
MC



MP



mPEG



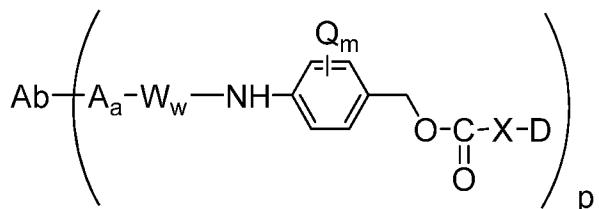
- 20 En algunas realizaciones, un componente de conector comprende una "unidad de aminoácido" (W). En algunas realizaciones tales, la unidad de aminoácido permite la escisión del conector por una proteasa, facilitando así la liberación del fármaco del inmunonconjugado tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas (Doronina et al., (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Unidades de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); fenilalanina-homolisina (phe-homolys); y N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácido puede comprender restos de aminoácidos que se producen naturalmente y/o aminoácidos secundarios y/o análogos de aminoácidos que no existen de forma natural, tales como citrulina. Las unidades de aminoácido pueden diseñarse y optimizarse para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

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

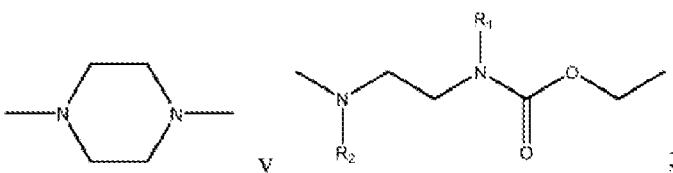
En algunas realizaciones, un componente de conector comprende una "unidad de espaciador" (Y) que une el

anticuerpo con un resto de fármaco, ya sea directamente o mediante una unidad extensora y/o una unidad de aminoácido. Una unidad de espaciador puede ser "auto-inmolativa" o una "no auto-inmolativa". Una unidad de espaciador "no auto-inmolativa" es una en la que parte o toda la unidad de espaciador sigue unida al resto de fármaco tras la escisión del ADC. Ejemplos de unidades de espaciador no auto-inmolativas incluyen, pero no se limitan a, una unidad de espaciador de glicina y una unidad de espaciador de glicina-glicina. En algunas realizaciones, la escisión enzimática de un ADC que contiene una unidad de espaciador de glicina-glicina por una proteasa asociada a célula tumoral produce la liberación de una glicina-glicina-resto de fármaco del resto de ADC. En algunas realizaciones tales, la glicina-glicina-resto de fármaco se somete a una etapa de hidrólisis en la célula tumoral, escindiendo así la unidad de espaciador de glicina-glicina del resto de fármaco.

Una unidad de espaciador "auto-inmolativa" permite la liberación del resto de fármaco. En ciertas realizaciones, una unidad de espaciador de un conector comprende una unidad de p-aminobencílico. En algunas realizaciones tales, un alcohol p-aminobencílico está unido a una unidad de aminoácido mediante un enlace amida, y se produce un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el fármaco (Hamann et al. (2005) Expert Opin., Ther. Patents (2005) 15:1087-1103). En algunas realizaciones, la unidad de espaciador comprende p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). En algunas realizaciones, un ADC que comprende un conector auto-inmolativo tiene la estructura:



en la que Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -nitro, o -ciano; m es un número entero que oscila de 0 a 4; X puede ser una o más unidades de espaciador adicionales o puede estar ausente; y p oscila de 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p oscila de 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5, o 1 a 4. Unidades de espaciador X a modo de ejemplo no limitante incluyen:

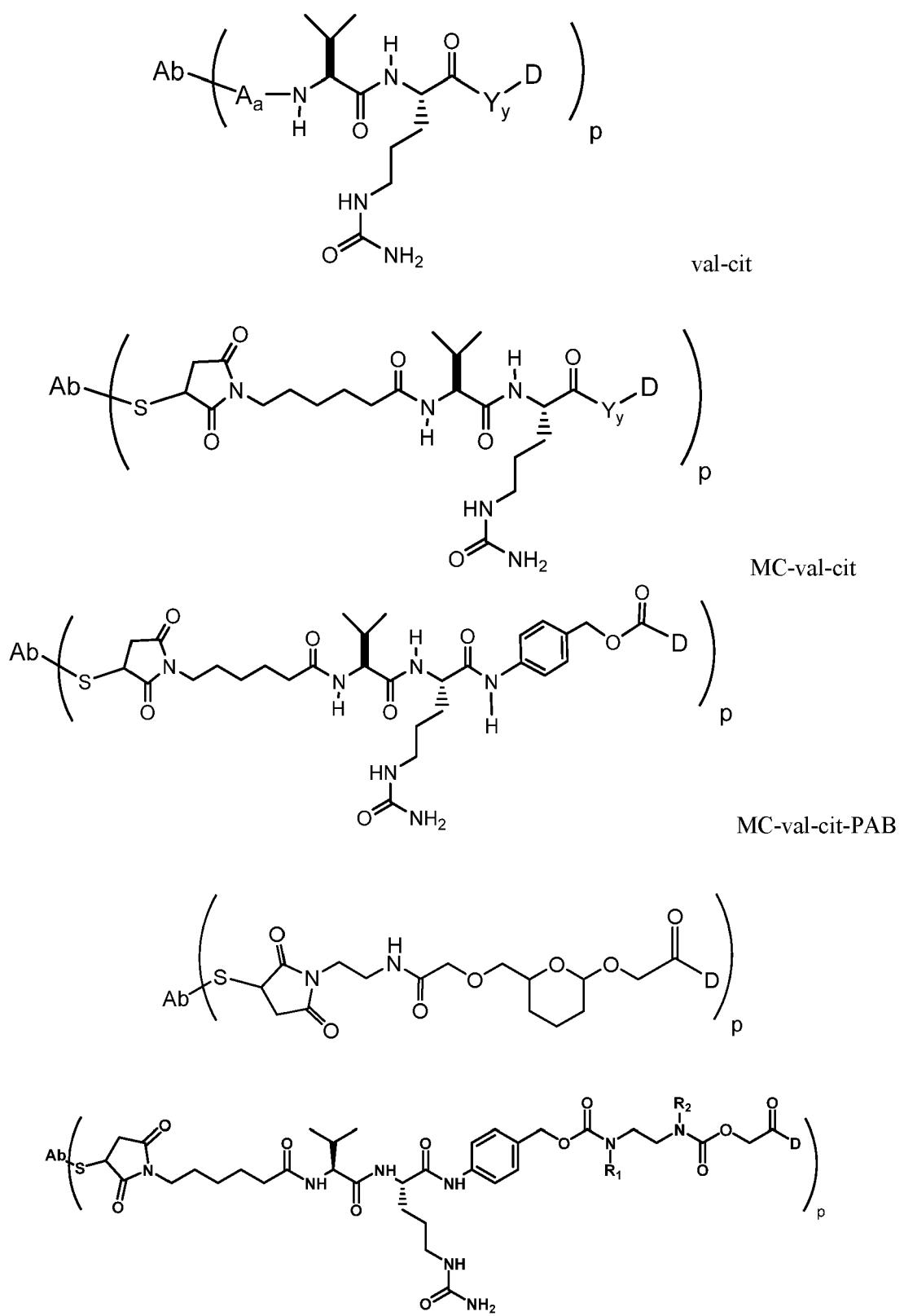


en la que R₁ y R₂ están seleccionados independientemente de H y alquilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, R₁ y R₂ son cada uno -CH₃.

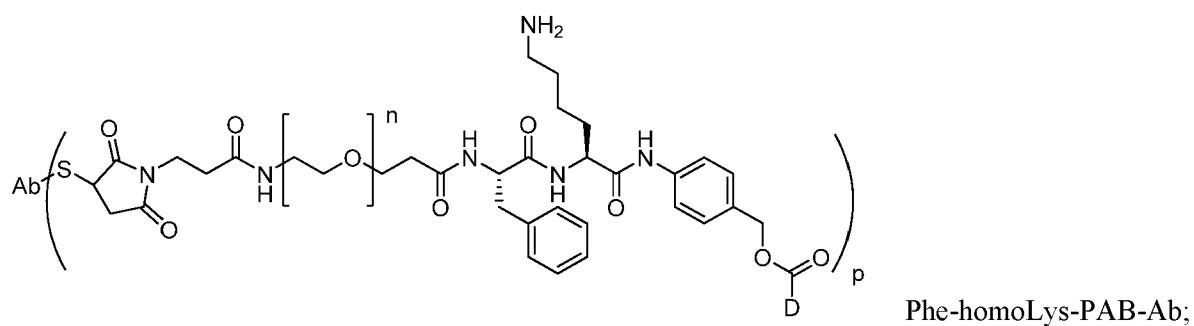
Otros ejemplos de espaciadores auto-inmolativos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tal como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (patente de EE.UU. N.º 7.375.078; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales.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

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

Conejtores a modo de ejemplo no limitante se muestran a continuación en el contexto de un ADC de fórmula I:



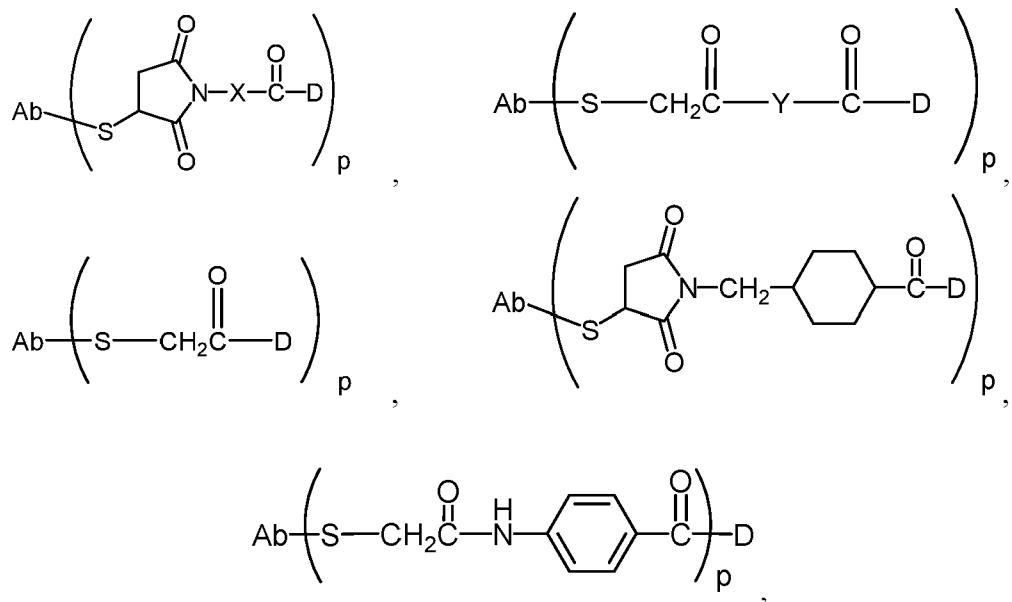
5 en las que R₁ y R₂ están seleccionados independientemente de H y alquilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, R₁ y R₂ son cada uno -CH₃.



en la que n es 0 a 12. En algunas realizaciones, n es 2 a 10. En algunas realizaciones, n es 4 a 8.

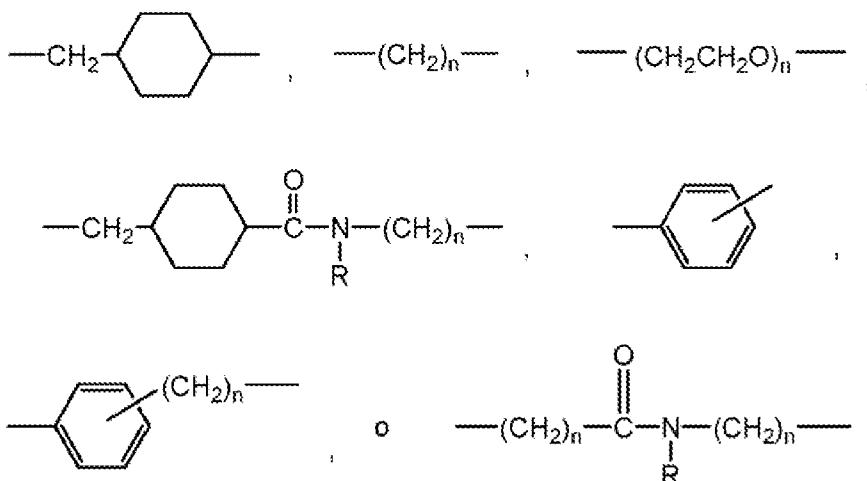
5

ADC a modo de ejemplo no limitante adicionales incluyen las estructuras:



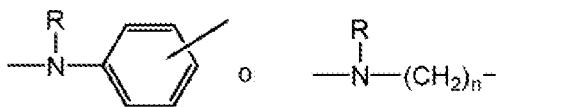
10

donde X es:



15

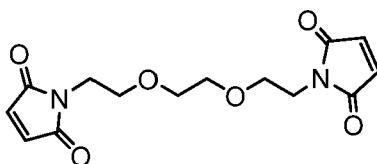
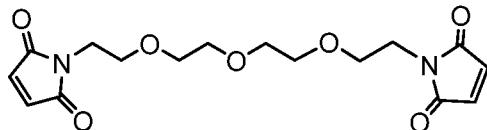
Y es:



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

En algunas realizaciones, un conector está sustituido con grupos que modulan la solubilidad y/o reactividad. Como ejemplo no limitante, un sustituyente cargado, tal como sulfonato (-SO₃⁻) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del conector reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del conector reactivo con el anticuerpo y/o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L (producto intermedio de anticuerpo-conector) con D, o D-L (producto intermedio de fármaco-conector) con Ab, dependiendo de la ruta de síntesis empleada para preparar el ADC. En algunas realizaciones, una porción del conector se acopla al anticuerpo y una porción del conector se acopla al fármaco, y entonces Ab-(porción de conector)^a se acopla a fármaco-(porción de conector)^b para formar el ADC de fórmula I.

15 Los compuestos proporcionados en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con los siguientes reactivos de conector: bis-maleimido-trioxietilenglicol (BMPEO), éster de N-(β-maleimidopropiloxi)-N-hidroxisuccinimida (BMPS), éster de N-(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS), éster de N-[γ-maleimidobutiriloxi]succinimida (GMBS), 1,6-hexano-bis-vinilsulfona (HBVS), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de succinimidilo (SBAP), yodoacetato de succinimidilo (SIA), (4-yodoacetil)aminobenzoato de succinimidilo (SIAB), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), 6-[(beta-maleimidopropionamido)hexanoato] de succinimidilo (SMPH), iminotiolano (IT), sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato de (SVSB), y que incluye reactivos de bis-maleimida: ditriobismaleimidoetano (DTME), 1,4-bismaleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bismaleimidohexano (BMH), bismaleimidooctano (BMOE), BM(PEG)₂ (mostrado abajo) y BM(PEG)₃ (mostrado abajo); derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). En algunas realizaciones, los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol de una cisteína en el anticuerpo a un resto de fármaco que contiene tiol, conector, o producto intermedio de conector-fármaco. Otros grupos funcionales que son reactivos con grupos tiol incluyen, pero no se limitan a, yodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, disulfuro, piridildisulfuro, isocianato e isoftiocianato.

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

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

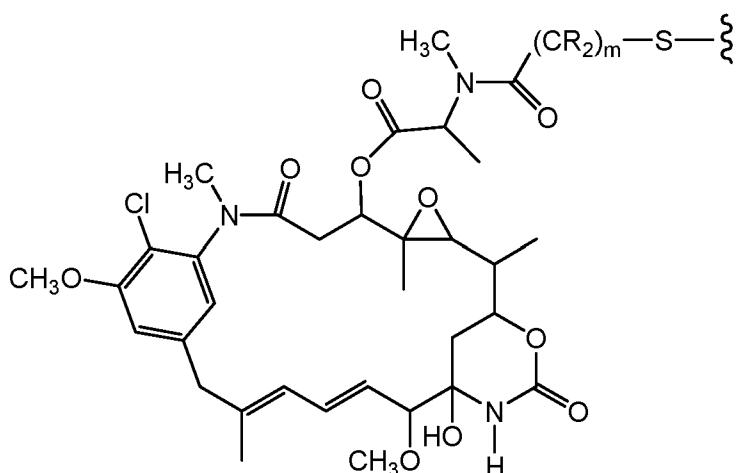
45 El ácido 1-isoftiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO94/11026.

50

b) Restos de fármaco

(1) *Maitansina y maitansinoides*

- En algunas realizaciones, un inmunoconjuguado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son derivados de maitansina y son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N.º 3896111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. N.º 4.151.042). Se desvelan maitansinoides sintéticos, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 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.
- 5 Los restos de fármacos de maitansinoide son restos de fármaco atractivos en conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química o derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles a derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante conectores no de disulfuro a anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra varias líneas celulares tumorales.
- 10 Ciertos maitansinoides adecuados para su uso como restos de fármacos de maitansinoide son conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales según métodos conocidos o producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973). Los maitansinoides también pueden prepararse sintéticamente según métodos conocidos.
- 15 Restos de fármacos de maitansinoide incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tales como: C-19-descloro (patente de EE.UU. N.º 4256746) (preparado, por ejemplo, por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-demetilo) +/-C-19-descloro (patentes de EE.UU. N.º 4361650 y 4307016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de EE.UU. N.º 4.294.757) (preparados por acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones del anillo aromático.
- 20 Restos de fármacos de maitansinoide incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (patente de EE.UU. N.º 4424219) (preparado, por ejemplo, mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH₂ OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE.UU. N.º 4450254) (preparado, por ejemplo, a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4364866) (preparado, por ejemplo, por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes de EE.UU. N.º 4313946 y 4315929) (por ejemplo, aislado de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (patentes de EE.UU. N.º 4362663 y 4322348) (preparado, por ejemplo, por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado, por ejemplo, por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).
- 25 Muchas posiciones en los compuestos de maitansinoide son útiles como posición de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace de éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencional. En algunas realizaciones, la reacción puede producirse 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 algunas realizaciones, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.
- 30 35 40 45 Restos de fármaco de maitansinoide incluyen aquellos que tiene la estructura:

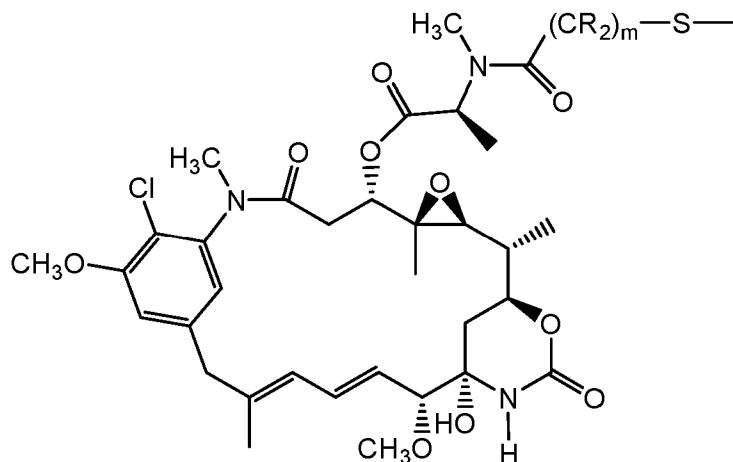


50 donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del resto de fármaco de maitansinoide a un conector de un ADC. Cada R puede ser independientemente H o un alquilo C₁-C₆. La cadena de alquileno que une

el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2 o 3 (documentos US 633410; US 5208020; Chari et al. (1992) Cancer Res. 52:127-131; Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623).

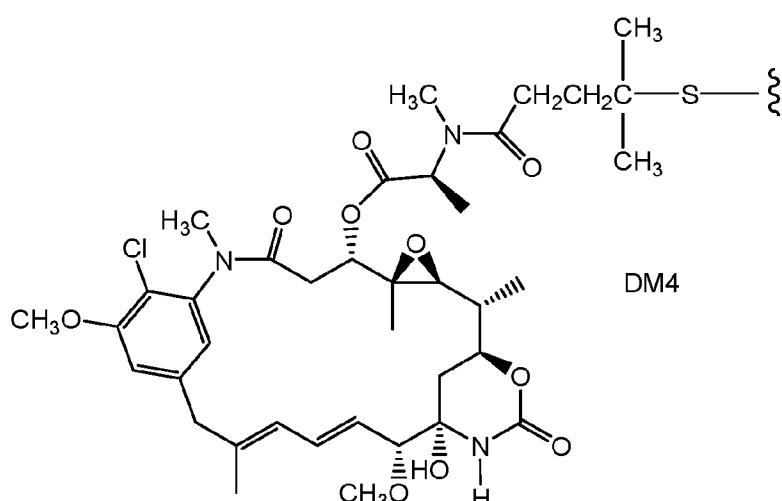
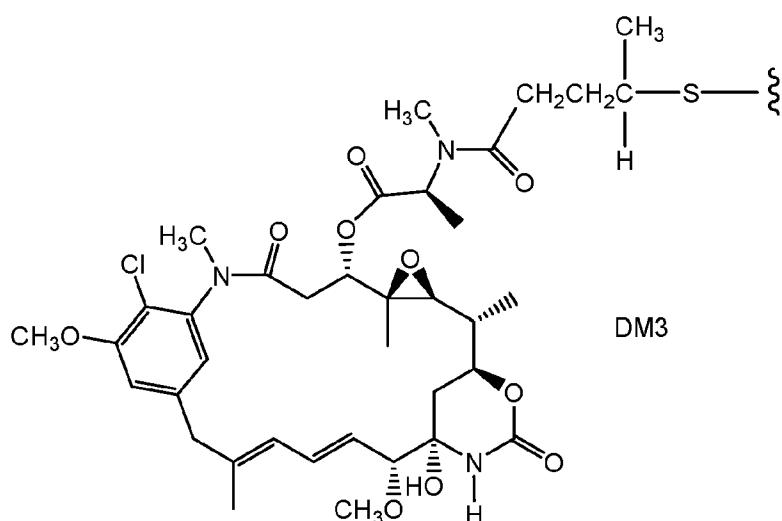
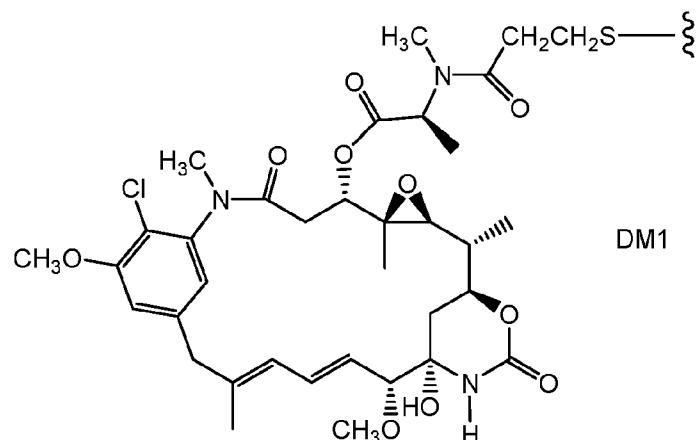
- 5 Todos los estereoisómeros del resto de fármaco de maitansinoide se contemplan para los ADC proporcionados en el presente documento, es decir, cualquier combinación de configuraciones R y S en los carbonos quirales (documentos US 7276497; US 6913748; US 6441163; US 633410 (RE39151); US 5208020; Widdison et al. (2006) J. Med. Chem. 49:4392-4408, que se incorporan por referencia en su totalidad). En una realización, el resto de fármaco de maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica:

10



Realizaciones a modo de ejemplo de restos de fármaco de maitansinoide incluyen, pero no se limitan a, DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:

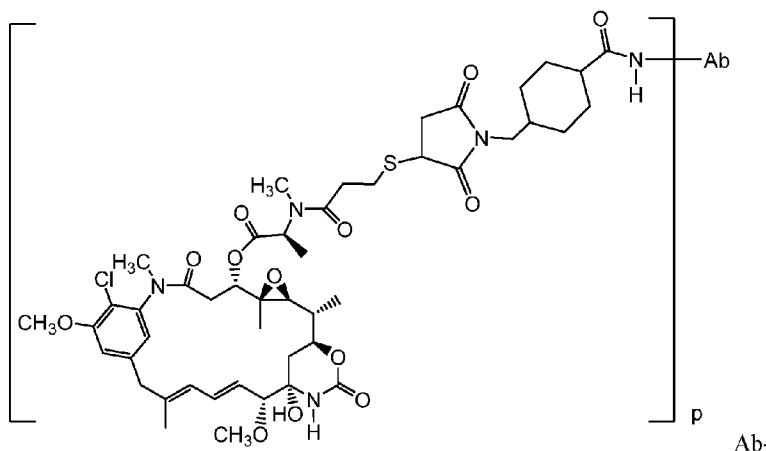
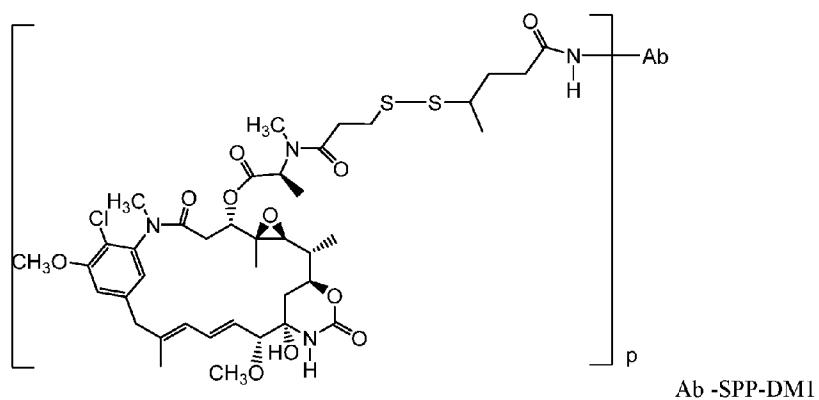
15



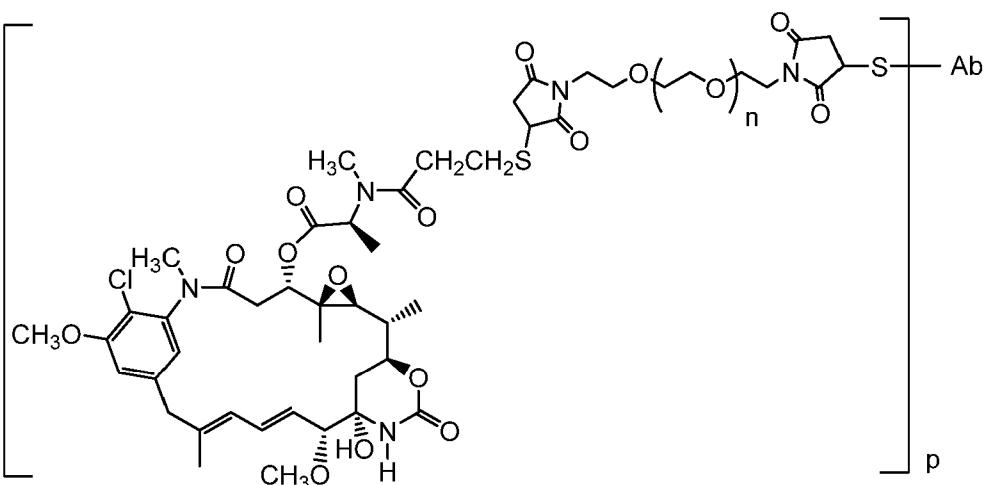
en las que la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del fármaco con un conector (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco.

5

Otros conjugados de anticuerpo-fármaco de maitansinoide a modo de ejemplo tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab es anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p es 1 a 10, o p es 1 a 7, p es 1 a 5, o p es 1 a 4):



Conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo donde DM1 está unido mediante un conector de BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



5

donde Ab es anticuerpo; n es 0, 1 o 2; y p es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, p es 1 a 10, p es 1 a 7, p es 1 a 5, o p es 1 a 4.

Los inmunoconjungados que contienen maitansinoides, métodos de preparación de los mismos y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.208.020 y 5.416.064; US 2005/0276812 A1; y la patente europea EP 0 425 235 B1. Véase también Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996); y Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992).

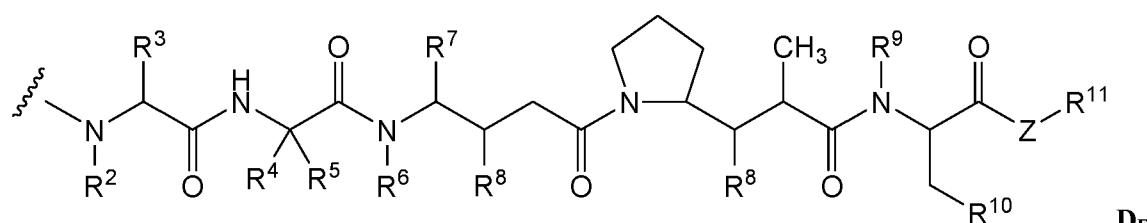
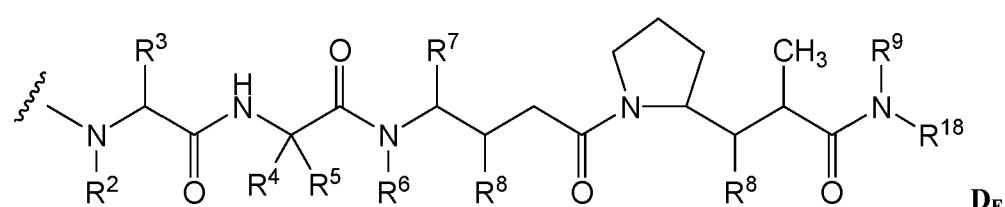
5 En algunas realizaciones, pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica de cualquiera del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.208.020. En algunas 10 realizaciones, ADC con un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo. En algunos casos, se espera que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potencie la citotoxicidad con respecto al uso del anticuerpo desnudo.

15 Grupos de enlace para la preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en el presente documento y los desvelados en la patente de EE.UU. N.º 5208020; patente EP 0 425 235 B1; Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); documentos US 2005/0276812 A1; y US 2005/016993 A1.

(2) Auristatinas y dolastatinas

20 Restos de fármaco incluyen dolastatinas, auristatinas, y análogos y derivados de los mismos (documentos US 5635483; US 5780588; US 5767237; US 6124431). Las auristatinas son derivados del compuesto de molusco marino dolastatina-10. Aunque no se pretende quedar ligado a teoría particular alguna, se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina/auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172; Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al. (2003) Blood 102(4):1458-1465).

30 Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos de fármaco de monometilaristatina unidos en el extremo N D_E y D_F, desvelados en los documentos US 7498298 y US 7659241:



35 en las que la línea ondulada de D_E y D_F indica el sitio de unión covalente a un anticuerpo o componente de conector de anticuerpo, e independientemente en cada localización:

40 R² está seleccionado de H y alquilo C₁-C₈;
R³ está seleccionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);
R⁴ está seleccionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);
R⁵ está seleccionado de H y metilo;

45 o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- en la que R^a y R^b están seleccionados independientemente de H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n está seleccionado de 2, 3, 4, 5 y 6;
R⁶ está seleccionado de H y alquilo C₁-C₈;
R⁷ está seleccionado de H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquil C₁-C₈-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈);

C₈), heterociclo C₃-C₈ y alquil C₁-C₈-(heterociclo C₃-C₈); cada R⁸ está seleccionado independientemente de H, OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y O-(alquilo C₁-C₈); R⁹ está seleccionado de H y alquilo C₁-C₈; R¹⁰ está seleccionado de arilo o heterociclo C₃-C₈; Z es O, S, NH o NR¹² en la que R¹² es alquilo C₁-C₈; R¹¹ está seleccionado de H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴ o -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂; m es un número entero que oscila de 1-1000; R¹³ es alquilo C₂-C₈; R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₈; cada aparición de R¹⁵ es independientemente H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H o -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈; cada aparición de R¹⁶ es independientemente H, alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_n-COOH; R¹⁸ está seleccionado de -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈) y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(carbociclo C₃-C₈); y n es un número entero que oscila de 0 a 6.

En una realización, R³, R⁴ y R⁷ son independientemente isopropilo o sec-butilo y R⁵ es -H o metilo. En una realización a modo de ejemplo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es -H y R⁷ es sec-butilo.

- 20 En otra realización más, R² y R⁶ son cada uno metilo, y R⁹ es -H.

En todavía otra realización, cada aparición de R⁸ es -OCH₃.

- 25 En algunas realizaciones, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es -H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃, y R⁹ es -H.

En una realización, Z es -O- o -NH-.

En una realización, R¹⁰ es arilo.

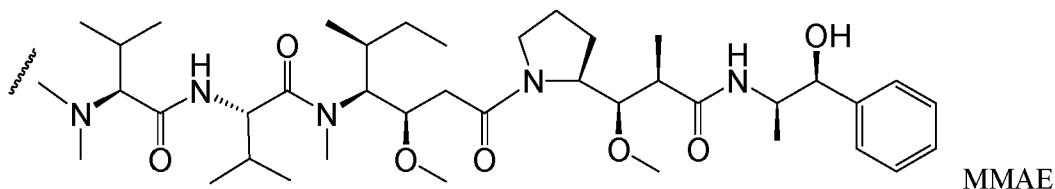
- 30 En una realización a modo de ejemplo, R¹⁰ es -fenilo.

En una realización a modo de ejemplo, si Z es -O-, R¹¹ es -H, metilo o t-butilo.

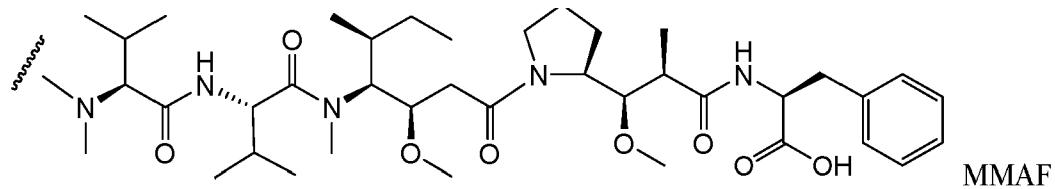
- 35 En una realización, si Z es -NH, R¹¹ es -CH(R¹⁵)₂ en la que R¹⁵ es -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, y R¹⁶ es -alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_n-COOH.

En otra realización, si Z es -NH, R¹¹ es -CH(R¹⁵)₂, en la que R¹⁵ es -(CH₂)_n-SO₃H.

- 40 Una realización de auristatina a modo de ejemplo de fórmula D_E es MMAE, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un conector (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:



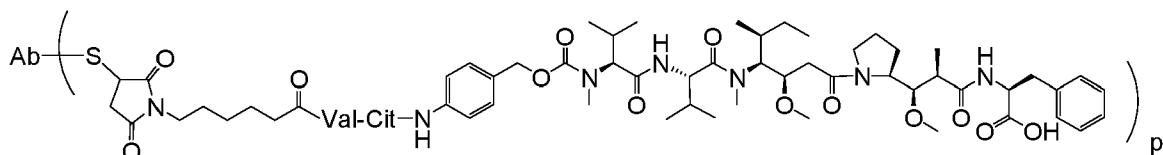
- 45 Una realización de auristatina a modo de ejemplo de fórmula D_F es MMAF, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a un conector (L) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:



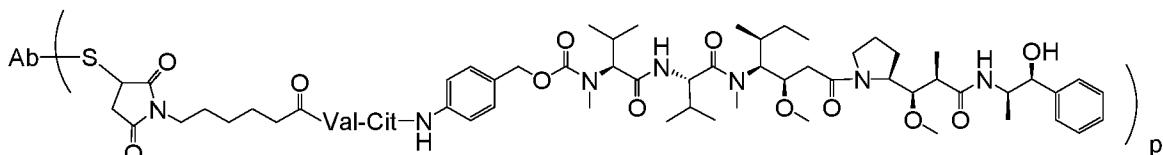
- 50 Otras realizaciones a modo de ejemplo incluyen compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones en carboxi de fenilalanina en el extremo C del resto de fármaco auristatina pentapeptido (documento WO 2007/008848) y compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones en la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C del resto de fármaco auristatina pentapeptido (documento WO 2007/008603).

- 55 Realizaciones a modo de ejemplo no limitante de ADC de fórmula I que comprende MMAE o MMAF y diversos

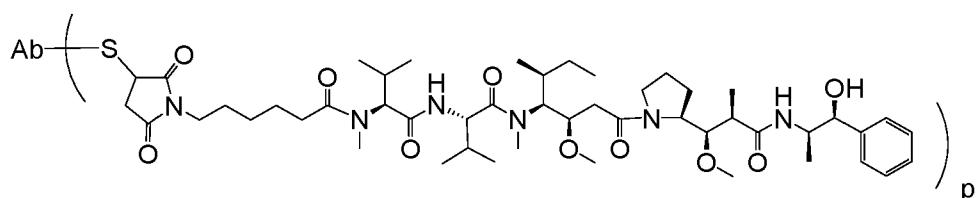
componentes de conector tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que "Ab" es un anticuerpo; p es 1 a aproximadamente 8, "Val-Cit" es un dipéptido valina-citrulina; y "S" es un átomo de azufre:



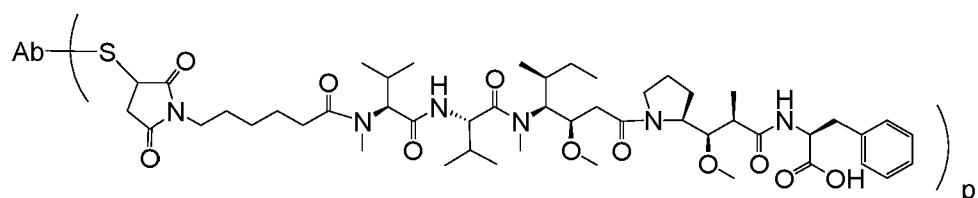
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

Realiz

aciones a modo de ejemplo no limitante de ADC de fórmula I que comprenden MMAF y diversos componentes de conector incluyen además Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Se ha mostrado que inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo por un conector que no es proteolíticamente escindido poseen actividad comparable a inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo por un conector proteolíticamente escindible (Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124). En algunas realizaciones tales, se cree que la liberación de fármaco se efectúa por la degradación del anticuerpo en la célula.

Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según un método de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág.

15 76-136, 1965, Academic Press). En algunas realizaciones, pueden prepararse restos del fármaco de auristatina/dolastatina según los métodos de: documentos US 7498298; US 5635483; US 5780588; Pettit et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al., *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; and Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

20 En algunas realizaciones, pueden prepararse restos del fármaco de auristatina/dolastatina de fórmulas D_E tales como MMAE, y D_F, tales como MMAF, y productos intermedios de fármaco-conector y derivados de los mismos, tal como MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE, usando métodos descritos en el documento US 7498298; Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; y Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784 y luego se conjugan con un anticuerpo de interés.

(3) Caliqueamicina

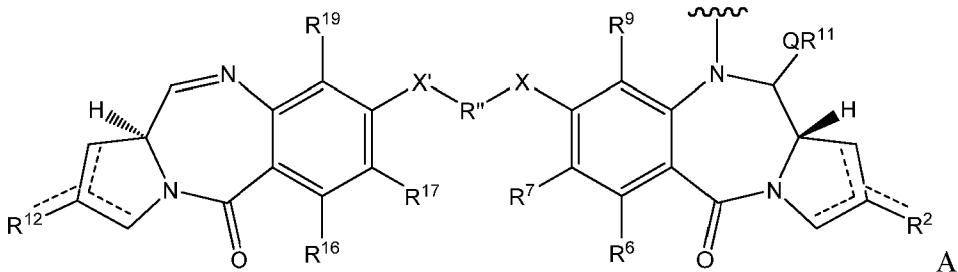
En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos, y análogos de la misma, son capaces de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares (Hinman et al. (1993) Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al. (1998) Cancer Research 58:2925-2928). La caliqueamicina tiene sitios de acción intracelular pero, en ciertos casos, no cruza fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo puede, en algunas realizaciones, potenciar enormemente sus efectos citotóxicos. Métodos a modo de ejemplo no limitante de la preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco con un resto de fármaco de caliqueamicina se describen, por ejemplo, en los documentos US 10 5712374; US 5714586; US 5739116; y US 5767285.

(4) *Pirrolobenzodiazepinas*

En algunas realizaciones, un ADC comprende una pirrolobenzodiazepina (PBD). En algunas realizaciones, los dímeros de PDB reconocen y se unen a secuencias de ADN específicas. El producto natural antramicina, una PBD, fue informado por primera vez en 1965 (Leimgruber, et al. (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5793-5795; Leimgruber, et al. (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5791-5793). Ya desde entonces, se ha informado de varias PBD, tanto que existen de forma natural como análogos (Thurston, et al. (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465) que incluyen dímeros del armazón tricíclico de PBD (documentos US 6884799; US 7049311; US 7067511; US 7265105; US 7511032; US 7528126; US 7557099). Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la estructura de dímero confiere la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor de ADN de la forma B, conduciendo a un encaje perfecto en el sitio de unión (Kohn, en Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237). Se ha mostrado que compuestos diméricos de PBD que llevan sustituyentes de arilo C2 son útiles como agentes citotóxicos (Hartley et al. (2010) Cancer Res. 70(17):6849-6858; Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7):2927-2941; Howard et al. (2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22):6463-6466).

Se han conjugado dímeros de PBD con anticuerpos y se mostró que el ADC resultante tenía propiedades antineoplásicas. Sitios de enlace a modo de ejemplo no limitante en el dímero de PBD incluyen el anillo de pirrolo de cinco miembros, la conexión entre las unidades de PBD y el grupo imina N10-C11 (documentos WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598).

Componentes de dímeros de PBD a modo de ejemplo no limitante de ADC son de fórmula A:



y sales y solvatos de los mismos, en la que:

la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al conector;
las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;

R² está seleccionado independientemente de H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente adicionalmente seleccionado de halógeno o dihalógeno, en los que R^D está seleccionado independientemente de R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halógeno;

R⁶ y R⁹ están seleccionados independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halógeno;

R⁷ está seleccionado independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halógeno;

Q está seleccionado independientemente de O, S y NH;

R¹¹ es o bien H, o bien R o, donde Q es O, SO₃M, donde M es un catión metálico;

R y R' están seleccionados cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₈, alquilo C₁₋₁₂, heterociclico C₃₋₈, heterociclo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos, y opcionalmente en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido;

R¹², R¹⁶, R¹⁹ y R¹⁷ son como se definen para R², R⁶, R⁹ y R⁷, respectivamente;

R'' es un grupo alquieno C₃₋₁₂, cuya cadena puede interrumpirse por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, cuyos anillos están

opcionalmente sustituidos; y

X y X' están seleccionados independientemente de O, S y N(H).

5 En algunas realizaciones, R y R' están seleccionados cada uno independientemente de grupos alquilo C₁₋₁₂, heterociclo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos, y opcionalmente en relación con el grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros opcionalmente sustituido.

10 En algunas realizaciones, R⁹ y R¹⁹ son H.

En algunas realizaciones, R⁶ y R¹⁶ son H.

15 En algunas realizaciones, R⁷ y R¹⁷ son ambos OR^{7A}, donde R^{7A} es alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^{7A} es Me. En algunas realizaciones, R^{7A} es Ch₂Ph, donde Ph es un grupo fenilo.

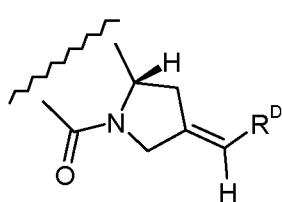
En algunas realizaciones, X es O.

En algunas realizaciones, R¹¹ es H.

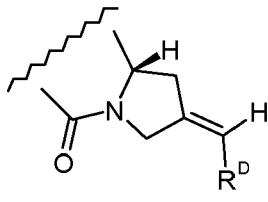
20 En algunas realizaciones, hay un doble enlace entre C2 y C3 en cada unidad de monómero.

25 En algunas realizaciones, R² y R¹² están seleccionados independientemente de H y R. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente R. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente arilo C₅₋₂₀ o arilo C₅₋₇ o arilo C₈₋₁₀ opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, R² y R¹² son independientemente fenilo, tienilo, naftilo, piridilo, quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, R² y R¹² están seleccionados independientemente de =O, =CH₂, =CH-R^D y =C(R^D)₂. En algunas realizaciones, R² y R¹² cada uno =CH₂. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno H. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno =O. En algunas realizaciones, R² y R¹² son cada uno =CF₂. En algunas realizaciones, R² y/o R¹² son independientemente =C(R^D)₂. En algunas realizaciones, R² y/o R¹² son independientemente =CH-R^D.

30 En algunas realizaciones, cuando R² y/o R¹² es =CH-R^D, cada grupo puede tener independientemente cualquier configuración mostrada a continuación:



(I)

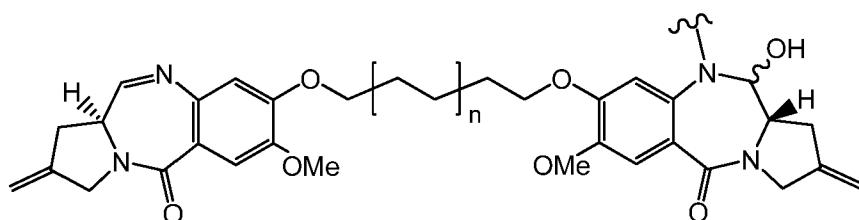


(II)

35 En algunas realizaciones, un =CH-R^D está en la configuración (I).

40 En algunas realizaciones, R" es un grupo alquileno C₃ o un grupo alquileno C₅.

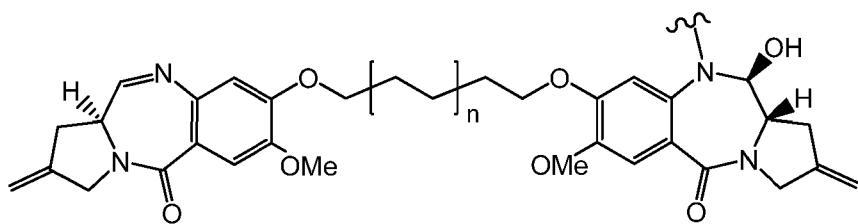
45 En algunas realizaciones, un componente de dímero de PBD a modo de ejemplo de un ADC tiene la estructura de fórmula A(I):



A(I);

45 en la que n es 0 o 1.

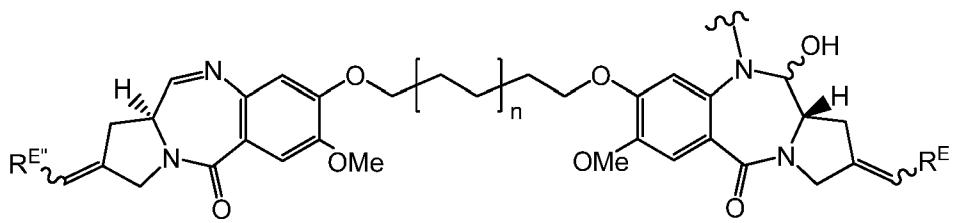
50 En algunas realizaciones, un componente de dímero de PBD a modo de ejemplo de un ADC tiene la estructura de fórmula A(II):



A(II);

en la que n es 0 o 1.

- 5 En algunas realizaciones, un componente de dímero de PBD a modo de ejemplo de un ADC tiene la estructura de fórmula A(III):

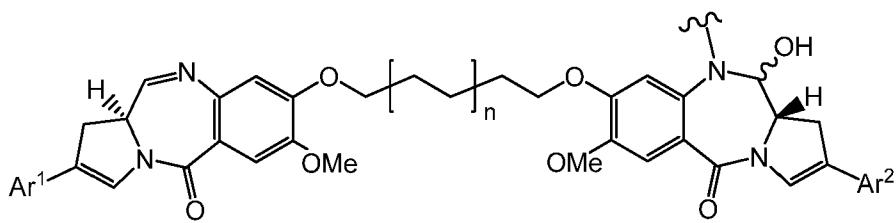


A(III);

- 10 en la que R^E y R^{E''} están seleccionados cada uno independientemente de H o R^D, en la que R^D se define como antes; y en la que n es 0 o 1.

En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E''} es H. En algunas realizaciones, R^E y R^{E''} son H. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E''} es R^D, en los que R^D es alquilo C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^E y/o R^{E''} es R^D, en los que R^D es metilo.

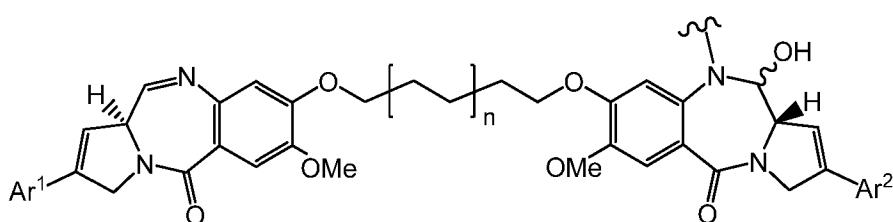
- 15 En algunas realizaciones, un componente de dímero de PBD a modo de ejemplo de un ADC tiene la estructura de fórmula A(IV):



A(IV);

- 20 en la que Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido; en los que Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes; y en la que n es 0 o 1.

- 25 En algunas realizaciones, un componente de dímero de PBD a modo de ejemplo de un ADC tiene la estructura de fórmula A(V):



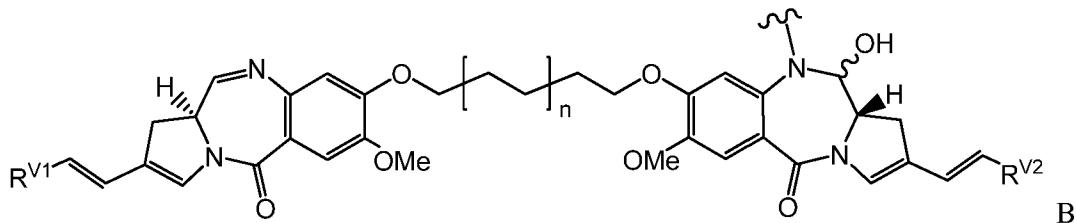
A(V);

- 30 en la que Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido; en los que Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes; y en la que n es 0 o 1.

35 En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² están seleccionados cada uno independientemente de fenilo, furanilo, tiofeno y piridilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente tien-2-ilo o tien-3-ilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente quinolinilo o

isoquinolinilo opcionalmente sustituido. El grupo quinolinilo o isoquinolinilo puede unirse al núcleo de PBD mediante cualquier posición de anillo disponible. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-5-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo y quinolin-8-ilo. En algunas realizaciones, el quinolinilo está seleccionado de quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo. El isoquinolinilo puede ser isoquinolin-1-ilo, isoquinolin-3-ilo, isoquinolin-4-ilo, isoquinolin-5-ilo, isoquinolin-6-ilo, isoquinolin-7-ilo e isoquinolin-8-ilo. En algunas realizaciones, el isoquinolinilo está seleccionado de isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo.

Componentes de dímero de PBD a modo de ejemplo no limitante adicionales de ADC son de fórmula B:



y sales y solvatos de los mismos, en la que:

la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al conector;

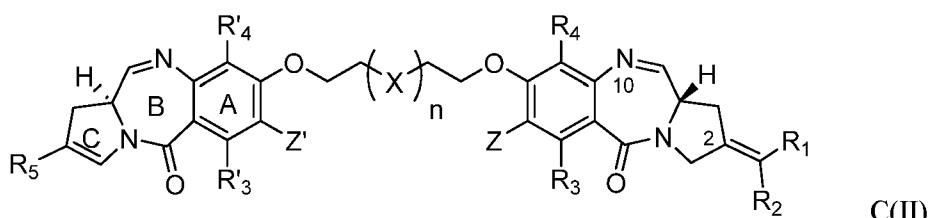
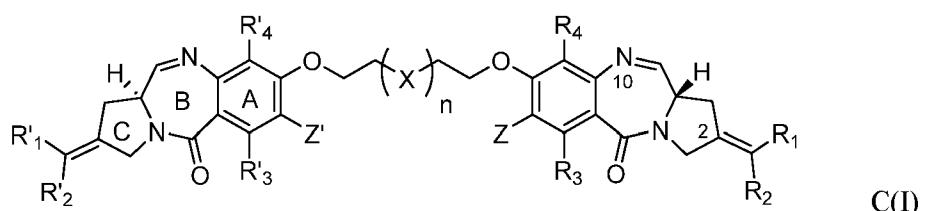
la línea ondulada conectada al OH indica la configuración S o R;

R^{V1} y R^{V2} están seleccionados independientemente de H, metilo, etilo y fenilo (fenilo que puede estar opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclo C₅₋₆; en la que R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes; y n es 0 o 1.

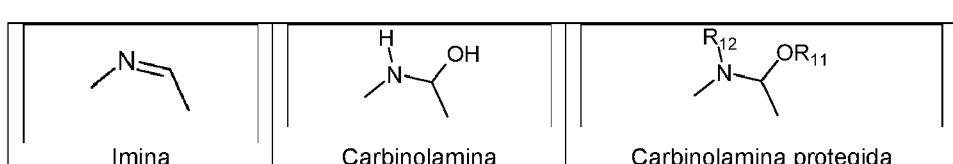
En algunas realizaciones, R^{V1} y R^{V2} están seleccionados independientemente de H, fenilo y 4-fluorofenilo.

En algunas realizaciones, un conector puede unirse en uno de los diversos sitios del resto de fármaco de dímero de PBD, que incluye la imina N10 del anillo B, la posición endo/exo C-2 del anillo C, o la unión de conexión que une los anillos A (véanse las estructuras C(I) y C(II) a continuación).

Componentes de dímero de PBD a modo de ejemplo no limitante de ADC incluyen las fórmulas C(I) y C(II):



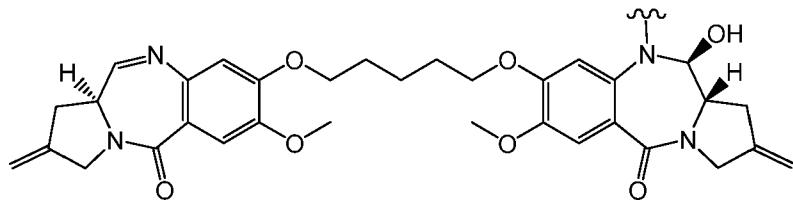
Las fórmulas C(I) y C(II) se muestran en su forma de imina N10-C11. Restos de fármacos de PBD a modo de ejemplo también incluyen las formas de carbinolamina y carbinolamina protegida también, como se muestra en la tabla a continuación:



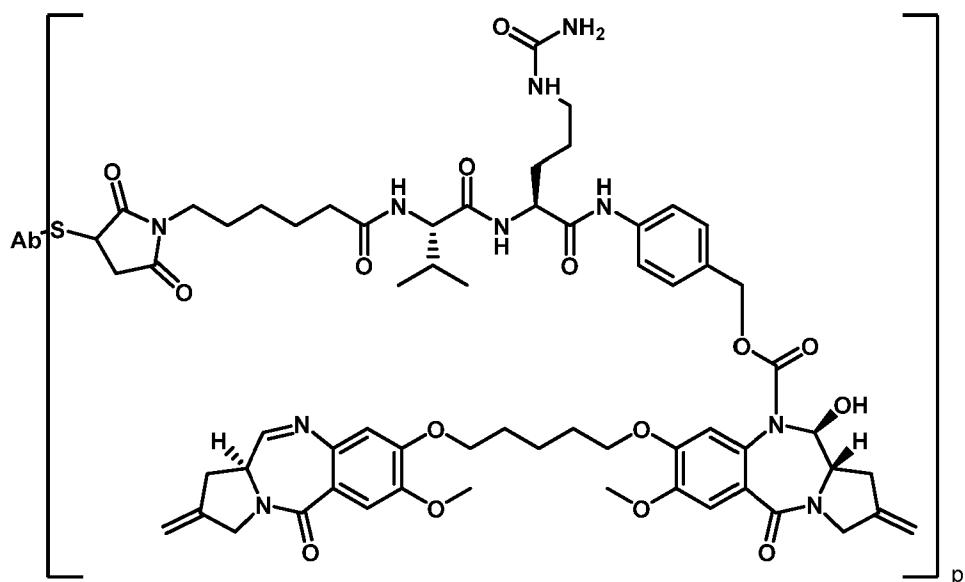
en las que:

- X es CH₂ (n = 1 a 5), N u O;
 Z y Z' están seleccionados independientemente de OR y NR₂, donde R es una cadena de alquilo primario, secundario o terciario que contiene 1 a 5 átomos de carbono;
 5 R₁, R'₁, R₂ y R'₂ están seleccionados cada uno independientemente de H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, arilo C₅₋₂₀ (incluyendo arilos sustituidos), grupos heteroarilo C₅₋₂₀, -NH₂, -NHMe, -OH y -SH, donde, en algunas realizaciones, las cadenas de alquilo, alquenilo y alquinilo comprenden hasta 5 átomos de carbono;
 10 R₃ y R'₃ están seleccionados independientemente de H, OR, NHR y NR₂, donde R es una cadena de alquilo primario, secundario o terciario que contiene 1 a 5 átomos de carbono;
 R₄ y R'₄ están seleccionados independientemente de H, Me y OMe;
 15 R₅ está seleccionado de alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, arilo C₅₋₂₀ (incluyendo arilos sustituidos con halógeno, nitró, ciano, alcoxi, alquilo, heterociclico) y grupos heteroarilo C₅₋₂₀, donde, en algunas realizaciones, las cadenas de alquilo, alquenilo y alquinilo comprenden hasta 5 átomos de carbono;
 20 R₁₁ es H, alquilo C₁-C₈, o un grupo protector (tal como acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ), 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc), o un resto que comprende una unidad auto-inmolativa tal como valina-citrulina-PAB);
 R₁₂ es H, alquilo C₁-C₈, o un grupo protector;
 en las que un hidrógeno de uno de R₁, R'₁, R₂, R'₂ o R₁₂ o un hidrógeno de -OCH₂CH₂(X) _nCH₂CH₂O-espaciador entre los anillos A se sustituye por un enlace conectado al conector de ADC.

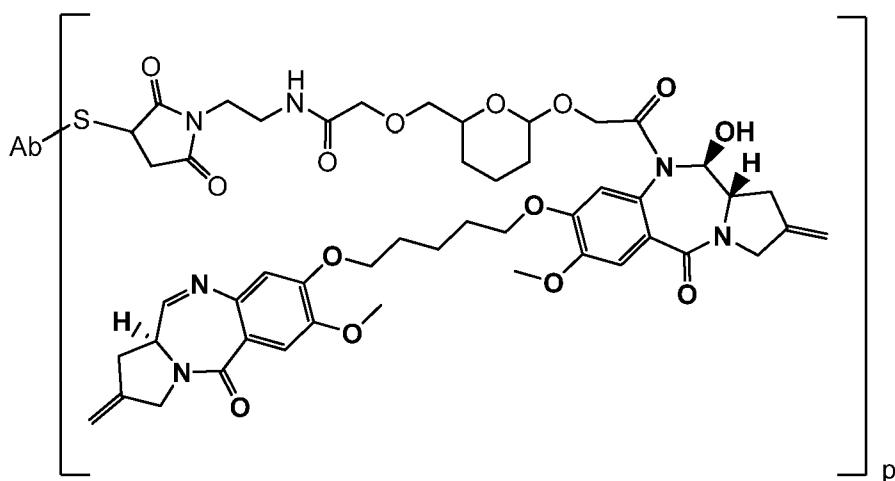
Porciones de dímero de PDB a modo de ejemplo de ADC incluyen, pero no se limitan a (la línea ondulada indica el sitio de unión covalente al conector):



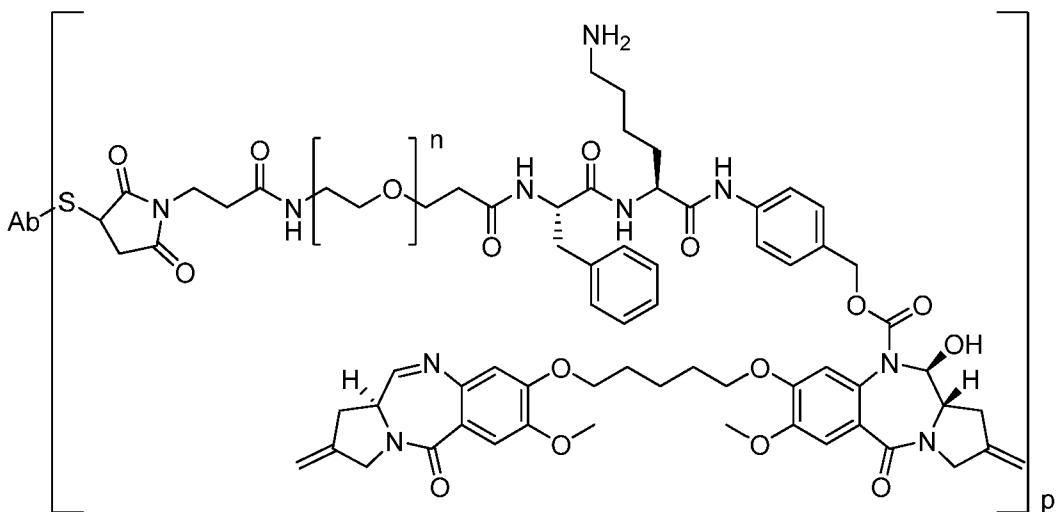
- 25 dímero de PBD;
- 30 Realizaciones a modo de ejemplo no limitante de ADC que comprenden dímeros de PBD tienen las siguientes estructuras:



dímero de PBD-val-cit-PAB-Ab:



dímero de PBD-maleimida-acetal-Ab;



dímero de PBD-Phe-homoLys-PAB-Ab,

en la que: n es 0 a 12. En algunas realizaciones, n es 2 a 10. En algunas realizaciones, n es 4 a 8. En algunas realizaciones, n está seleccionado de 4, 5, 6, 7 y 8.

Los conectores de dímero de PBD-val-cit-PAB-Ab y dímero de PBD-Phe-homoLys-PAB-Ab son escindibles por proteasas, mientras que el conector de dímero de PBD-maleimida-acetal es lábil en ácido.

Pueden prepararse dímeros de PBD y ADC que comprenden dímeros de PBD según métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598.

(5) Antraciclinas

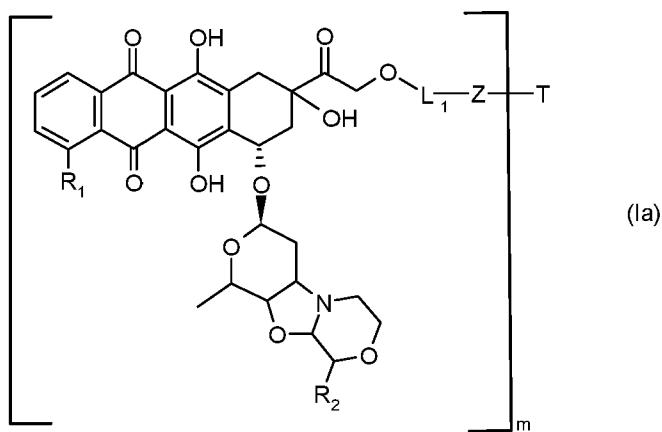
- En algunas realizaciones, un ADC comprende antraciclinas. Las antraciclinas son compuestos antibióticos que presentan actividad citotóxica. Aunque no se pretende quedar ligado a teoría particular alguna, estudios han indicado que las antraciclinas pueden operar para destruir células por varios mecanismos diferentes, que incluyen: 1) intercalación de las moléculas de fármaco en el ADN de la célula inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de ADN; 2) producción por el fármaco de radicales libres que entonces reaccionan con macromoléculas celulares para producir daño a las células, y/o 3) interacciones de las moléculas de fármaco con la membrana celular (véanse, por ejemplo, C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" en Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. en pp. 97-102). Debido a su potencial citotóxico, las antraciclinas se han usado en el tratamiento de numerosos cánceres tales como leucemia, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de ovario y sarcomas (véase, por

ejemplo, P.H- Wiernik, en Anthracycline: Current Status And New Developments p 11).

Antraciclinas a modo de ejemplo no limitante incluyen doxorubicina, epirubicina, idarubicina, daunomicina, nemorubicina, y derivados de las mismas. Inmunoconjungados y profármacos de daunorubicina y doxorubicina han sido preparados y estudiados (Kratz et al. (2006) Current Med. Chem. 13:477-523; Jeffrey et al. (2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362; Torgov et al. (2005) Bioconj. Chem. 16:717-721; Nagy et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834; Dubowchik et al. (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532; King et al. (2002) J. Med. Chem. 45:4336-4343; documentos EP 0328147; US 6630579). El conjugado de anticuerpo-fármaco BR96-doxorubicina reacciona específicamente con el antígeno asociado a tumor Lewis-Y y ha sido evaluado en estudios de fase I y II (Saleh et al. (2000) J. Clin. Oncology 18:2282-2292; Ajani et al. (2000) Cancer Jour. 6:78-81; Tolcher et al. (1999) J. Clin. Oncology 17:478-484).

PNU-159682 es un potente metabolito (o derivado) de nemorubicina (Quintieri, et al. (2005) Clinical Cancer Research 11(4):1608-1617). La nemorubicina es un análogo semisintético de la doxorubicina con un grupo 2-metoximorfolino en el amino de glucósido de la doxorubicina y ha estado en evaluación clínica (Grandi et al. (1990) Cancer Treat. Rev. 17:133; Ripamonti et al. (1992) Brit. J. Cancer 65:703), que incluye ensayos de fase II/III para carcinoma hepatocelular (Sun et al. (2003) Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs1448; Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44:1st Ed, Abs 4649; Pacciari et al. (2006) Jour. Clin. Oncology 24:14116).

Un ADC a modo de ejemplo no limitante que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina se muestra en la fórmula la:



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

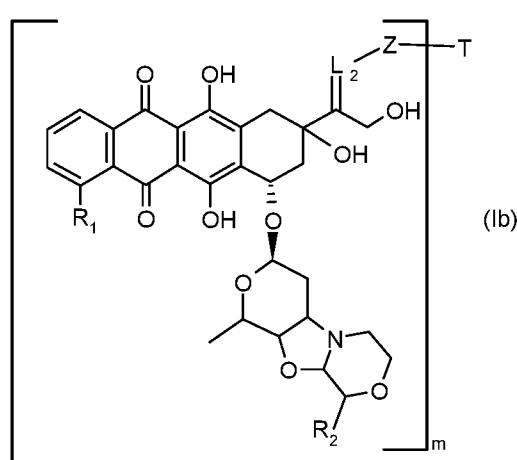
L₁ y Z juntos son un conector (L) como se describe en el presente documento;

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

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

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

Un ADC a modo de ejemplo no limitante adicional que comprende nemorubicina o derivados de nemorubicina se muestra en la fórmula lb:



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

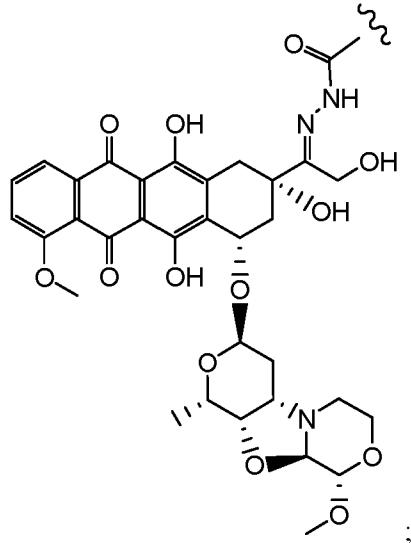
L₂ y Z son juntos un conector (L) como se describe en el presente documento;

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

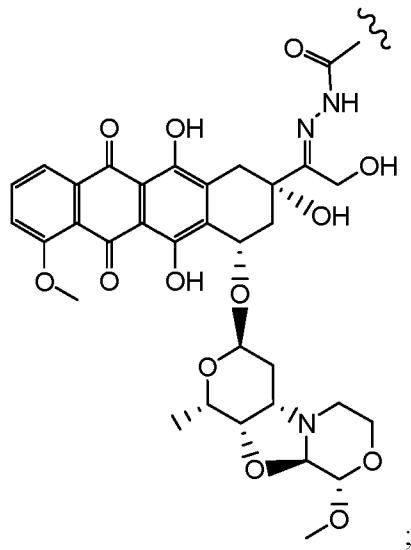
m es 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, m es 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5, o 1 a 4.

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

- 10 10 En algunas realizaciones, el componente de nemorubicina de un ADC que contiene nemorubicina es PNU-159682. En algunas realizaciones tales, la porción de fármaco de ADC puede tener una de las siguientes estructuras:



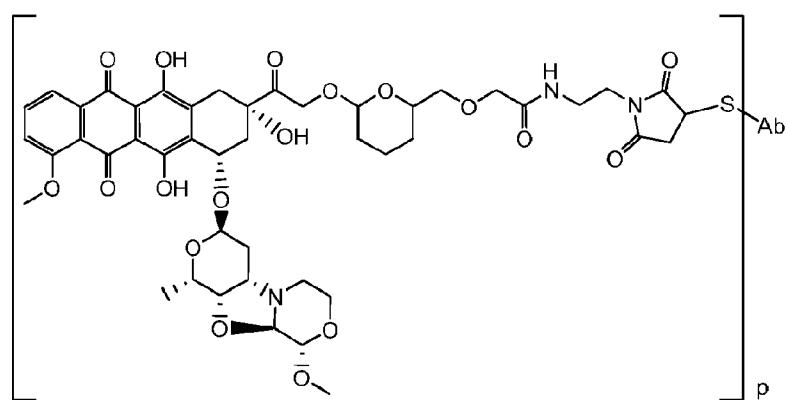
15 o



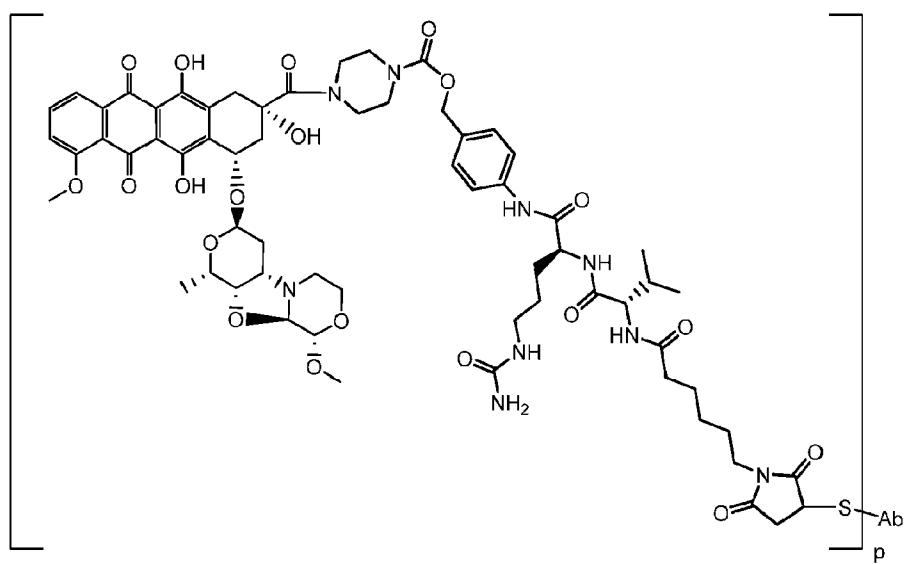
en las que la línea ondulada indica la unión al conector (L).

- 20 20 Las antraciclinas, que incluyen PNU-159682, pueden conjugarse con anticuerpos mediante varios sitios de enlace y varios conectores (documentos US 2011/0076287; WO2009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124), que incluyen los conectores descritos en el presente documento.

- 25 25 ADC a modo de ejemplo que comprenden una nemorubicina y conector incluyen, pero no se limitan a:

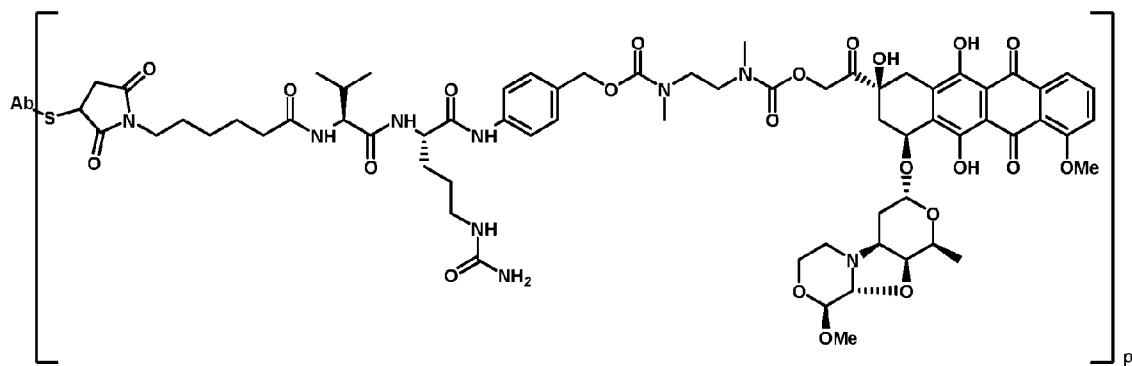


PNU-159682-acetal de maleimida -Ab;



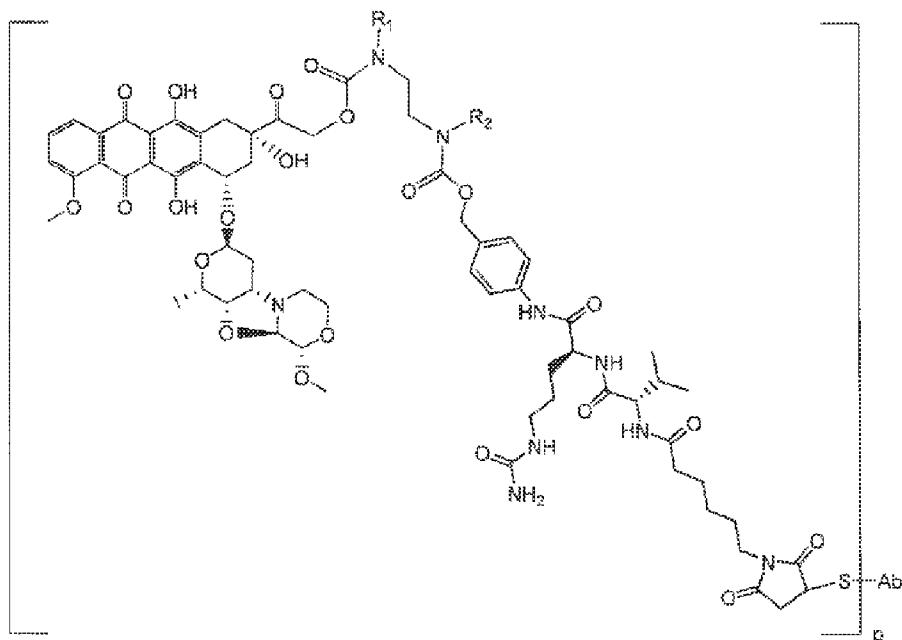
5

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



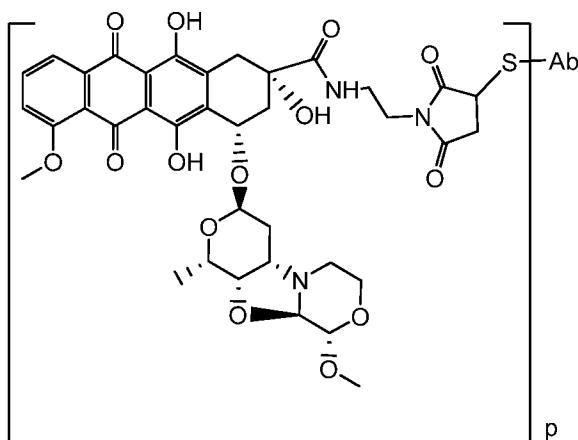
10

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



PNU-159682-val-cit-PAB-espaciador(R^1R^2)-Ab, en la que: R_1 y R_2 están seleccionados independientemente de H y alquilo C₁-C₆; y

5



PNU-159682-maleimida-Ab.

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

- 15 (6) Otros restos de fármaco
Restos de fármaco también incluyen geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. 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); y toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas, que incluyen, pero no se limitan a, cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232.

- 20 25 Restos de fármaco también incluyen compuestos con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa).

En ciertas realizaciones, un inmunoconjunto puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles

varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. En algunas realizaciones, cuando un inmunoconjungado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc⁹⁹ o I¹²³, o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, IRM), tal como circonio-89, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. El circonio-89 puede ser complejado con diversos agentes quelantes de metales y conjungarse con anticuerpos, por ejemplo, para la obtención de imágenes de PET (documento WO 2011/056983).

10 Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el inmunoconjungado de formas conocidas. Por ejemplo, puede biosintetizarse o sintetizarse químicamente un péptido usando precursores de aminoácido adecuados que comprenden, por ejemplo, uno o más átomos de flúor-19 en lugar de uno o más hidrógenos. En algunas realizaciones, marcas tales como Tc⁹⁹, I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ pueden unirse mediante un resto de cisteína en el anticuerpo. En algunas realizaciones, el itrio-90 puede unirse mediante un resto de lisina del anticuerpo. En algunas 15 realizaciones, puede usarse el método YODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe ciertos otros métodos.

20 En ciertas realizaciones, un inmunoconjungado puede comprender un anticuerpo conjugado con una enzima activadora de profármaco. En algunas de tales realizaciones, una enzima activadora de profármaco convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de péptido, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco activo, tal como un fármaco antineoplásico. Tales inmunoconjungados son útiles, en algunas realizaciones, en terapia con profármacos mediada por enzimas dependiente de anticuerpos ("ADEPT"). Las enzimas que pueden 25 conjungarse con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fosfatasas alcalinas, que son útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatas, 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 antineoplásico 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 30 contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, que son útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como β-galactosidasa y neuramidasa, que son útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β-lactamasa, que es útil 35 para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidas, tales como penicilina V amidasa y penicilina G amidasa, que son útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. En algunas realizaciones, pueden unirse covalentemente enzimas a anticuerpos por técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

c) Carga de fármaco

40 La carga de fármaco se representa por p, el número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármaco puede oscilar de 1 a 20 restos de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con varios restos de fármaco de 1 a 20. El número promedio de restos de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y HPLC. También puede 45 determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo en el que p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco puede lograrse por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

50 Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitada por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, si la unión es un tiol de la cisteína, como en ciertas realizaciones a modo de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de la cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales pueda unirse un conector. En ciertas realizaciones, carga de fármaco superior, por ejemplo p >5, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de 55 permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco promedio para un ADC oscila de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. De hecho, se ha mostrado que para ciertos ADC, la relación óptima de restos de fármaco por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser aproximadamente 2 a aproximadamente 5 (documento US 7498298).

60 En ciertas realizaciones, menos del máximo teórico de restos de fármaco se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, restos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco-conector o reactivo de conector, como se trata más adelante. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a un resto de fármaco; de hecho, la mayoría de los restos de tiol de la cisteína en anticuerpos existen como puentes disulfuro. En ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletifosfina (TCEP), bajo condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de la cisteína 65

reactivos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

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

Debe entenderse que si más de un grupo nucleófilo reacciona con un producto intermedio de fármaco-conector o reactivo de conector, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla por un ensayo de anticuerpos de ELISA dual que es específico para anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales pueden identificarse en la mezcla por espectroscopía de masas y separarse por HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, McDonagh et al. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J. et al., "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Resumen N.º 624, Asociación estadounidense para la investigación del cáncer, Reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004, Alley, S.C. et al., "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates", Resumen N.º 627, Asociación estadounidense para la investigación del cáncer, Reunión anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004; Proceedings of the AACR, volumen 45, marzo de 2004). En ciertas realizaciones, un ADC homogéneo con un único valor de carga puede aislarse de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía.

d) Ciertos métodos de preparación de Inmunoconjungados

Puede prepararse un ADC de fórmula I por varias vías empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de conector bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de conector bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Métodos de preparación a modo de ejemplo de un ADC de fórmula I mediante la última vía se describen en el documento US 7498298.

Grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBr, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol) o tricarboniletifosfina (TCEP), de forma que el anticuerpo se reduce completamente o parcialmente. Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la modificación de restos de lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar restos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), produciendo la conversión de una amina en un tiol. También pueden introducirse grupos de tiol reactivos en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos de variante que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco proporcionados en el presente documento también pueden producirse mediante reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo de aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un reactivo de conector o fármaco. Grupos nucleófilos útiles en un reactivo de conector incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrófilos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de conector o fármaco. En otra realización, los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehido o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de conector o restos de fármaco. Los grupos de la base de Schiff de la imina resultante pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con cualquier galactosa oxidasa, o meta-peroxidato de sodio, puede dar grupos carbonilo (aldehido y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen restos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peroxidato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Un aldehído tal puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o conector nucleófilo.

Grupos nucleófilos a modo de ejemplo en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBr, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencílo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

Reactivos de reticulante a modo de ejemplo no limitante que pueden usarse para preparar ADC se describen en el presente documento en la sección titulada "Conectores a modo de ejemplo". Se conocen en la técnica métodos de uso de tales reactivos de reticulante para unir dos restos, que incluyen un resto proteináceo y un resto químico. En algunas realizaciones, puede prepararse una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede comprender regiones que codifican el anticuerpo y porciones citotóxicas del conjugado, ya sean adyacentes entre sí o estén separadas por una región que codifica un conector péptido que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el pre-direcciónamiento de tumores, en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de eliminación y entonces administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un fármaco o radionucleótido).

E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-FcRH5 proporcionados en el presente documento son útiles para detectar la presencia de FcRH5 (por ejemplo, FcRH5) en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento, engloba detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En ciertas realizaciones, tales tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan FcRH5 a niveles más altos con respecto a otros tejidos, por ejemplo, linfocitos B y/o tejidos asociados a linfocitos B. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos de detección de la presencia de FcRH5 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, 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 se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FcRH5 y FcRH5. En un aspecto, la invención proporciona un método de diagnóstico de un trastorno asociado a elevada expresión de FcRH5. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-FcRH5; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativamente o cualitativamente) de FcRH5 por la célula de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-FcRH5 a FcRH5; y comparar el nivel de expresión de FcRH5 por la célula de prueba con el nivel de expresión de FcRH5 por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen de tejido que la célula de prueba o una célula que expresa FcRH5 a niveles comparables a una célula normal tal), en las que un nivel más alto de expresión de FcRH5 por la célula de prueba en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a elevada expresión de FcRH5. En ciertas realizaciones, la célula de prueba se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado a elevada expresión de FcRH5. En ciertas realizaciones, el trastorno es un trastorno proliferativo de células, tales como un cáncer o un tumor. En algunas realizaciones, FcRH5 es FcRH5c. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

Trastornos proliferativos de células a modo de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo descrito en el presente documento incluyen un trastorno de linfocitos B y/o un trastorno proliferativo de linfocitos B que incluye, pero no se limita a, linfoma, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recidivante, LNH de escasa malignidad recidivante, LNH resistente al tratamiento, LNH de escasa malignidad resistente al tratamiento, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-FcRH5 para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método de detección de la presencia de FcRH5 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-FcRH5 como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FcRH5 a FcRH5, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-FcRH5 y FcRH5 en la muestra biológica. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-FcRH5 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-FcRH5, por ejemplo donde FcRH5 es un biomarcador para la selección de pacientes. En una realización adicional, la muestra biológica es una célula o tejido

(por ejemplo, material de biopsia). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

- 5 En una realización adicional, se usa un anticuerpo anti-FcRH5 *in vivo* para detectar, por ejemplo, por obtención de imágenes *in vivo*, un cáncer FcRH5-positiva en un sujeto, por ejemplo, para los fines de diagnóstico, pronóstico o estadificación del cáncer, determinación de la evolución apropiada de la terapia, o monitorización de la respuesta de un cáncer a la terapia. Un método conocido en la técnica para la detección *in vivo* es la inmuno-tomografía de emisión de positrones (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen et al., *The Oncologist* 12:1379-1389 (2007) y Verel et al., *J. Nucl Med.* 44:1271-1281 (2003). En tales realizaciones, se proporciona un método para detectar un cáncer FcRH5-positiva en un sujeto, comprendiendo el método administrar un anticuerpo anti-FcRH5 marcado a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene un cáncer FcRH5-positiva, y detectar el anticuerpo anti-FcRH5 marcado en el sujeto, en las que la detección del anticuerpo anti-FcRH5 marcado indica un cáncer FcRH5-positiva en el sujeto. En ciertas de tales realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 marcado comprende un anticuerpo anti-FcRH5 conjugado con un emisor de positrones, tal como ⁶⁸Ga, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁷⁶Br, ⁸⁹Zr y ¹²⁴I. En una realización particular, el emisor de positrones es ⁸⁹Zr. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.
- 10 15 20 25
- En realizaciones adicionales, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo anti-FcRH5 inmovilizado a un sustrato con una muestra biológica que va a probarse para la presencia de FcRH5, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti-FcRH5, y detectar si el segundo anti-FcRH5 se une a un complejo entre el primer anticuerpo anti-FcRH5 y FcRH5 en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio de soporte, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, portaobjetos, chips, y otros sustratos. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula, sangre o tejido (por ejemplo, material de biopsia)
- 30 35 40 45 50
- Trastornos a modo de ejemplo que pueden diagnosticarse o detectarse según cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen cánceres FcRH5-positiva, tales como enfermedad proliferativa de linfocitos B FcRH5-positiva, neoplasia de células plasmáticas FcRH5-positiva y mieloma múltiple FcRH5-positiva. En algunas realizaciones, un cáncer FcRH5-positiva se detecta por inmunohistoquímica anti-FcRH5 (IHC) o hibridación *in situ* (ISH). En algunas realizaciones, un cáncer FcRH5-positiva es un cáncer que expresa FcRH5 según un ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta ARNm de FcRH5. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa.
- 55 60 65
- En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-FcRH5 marcados. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. Marcas incluyen, pero no se limitan a, marcas o restos que se detectan directamente (tales como marcas fluorescentes, cromóforas, electrodensas, quimioluminiscentes y radiactivas), además de restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Marcas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos tales como quelatos de las tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelifera, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasa de sacárido, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas 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 otra realización, una marca es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, pero no se limitan a, ⁶⁸Ga, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁷⁶Br, ⁸⁹Zr y ¹²⁴I. En una realización particular, un emisor de positrones es ⁸⁹Zr.

F. Formulaciones farmacéuticas

- 55 60 65
- Se preparan formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-FcRH5 o inmunoconjungado como se describe en el presente documento mezclando tal anticuerpo o inmunoconjungado que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilmonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol,

trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP a modo de ejemplo y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglicanas adicional tales como condroitinasas. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

Formulaciones de anticuerpo o inmunoconjungado liofilizadas a modo de ejemplo se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.267.958. Formulaciones de anticuerpo o inmunoconjungado acuosas incluyen aquellas descritas en la patente de EE.UU. N.º 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tapón de histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afectan adversamente entre sí.

Los principios activos pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo y/o inmunoconjungado, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas, o microcápsulas.

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

35 G. Métodos terapéuticos y composiciones

Cualquiera de los anticuerpos anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos contra FcRH5) y/o inmunoconjungados proporcionados en el presente documento puede usarse en métodos, por ejemplo, métodos terapéuticos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

En un aspecto, un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado proporcionados en el presente documento se usan en un método de inhibición de la proliferación de una célula FcRH5-positiva, comprendiendo el método exponer la célula al anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado a FcRH5 (por ejemplo, FcRH5c) sobre la superficie de la célula, inhibiéndose así la proliferación de la célula. En ciertas realizaciones, el método es un método *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones adicionales, la célula es un trastorno proliferativo de linfocitos B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de células está asociado a elevada expresión y/o actividad de FcRH5 (por ejemplo, FcRH5c). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de linfocitos B está asociado a elevada expresión de FcRH5 sobre la superficie de un linfocito B. En ciertas realizaciones, el trastorno proliferativo de linfocitos B es un tumor o un cáncer. En algunas realizaciones, el trastorno proliferativo de linfocitos B es una neoplasia de células plasmáticas. En algunas realizaciones, la neoplasia de células plasmáticas es mieloma múltiple, plasmacitoma y/o MGUS. Ejemplos de trastornos proliferativos de linfocitos B que van a ser tratados por los anticuerpos y/o inmunoconjungados de la invención incluyen, pero no se limitan a, linfoma, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recidivante, LNH de escasa malignidad recidivante, LNH resistente al tratamiento, LNH de escasa malignidad resistente al tratamiento, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico pequeño, leucemia, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia linfocítica aguda (LLA) y/o linfoma de células del manto.

La presencia de diversos biomarcadores en una muestra puede analizarse por varias metodologías, muchas de las cuales son conocidas en la técnica y entendidas por el experto, que incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica ("IHC"), análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, citometría de flujo activada por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos cuantitativos basados en sangre (como, por ejemplo, ELISA de suero), ensayos bioquímicos de actividad enzimática,

hibridación *in situ*, análisis de Southern, análisis de Northern, secuenciación del genoma completo, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") que incluye PCR cuantitativa en tiempo real ("qRT-PCR") y otros métodos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares, ARN-Seq, FISH, análisis de micromatrices, pauta de expresión génica, y/o análisis de expresión génica en serie ("SAGE"), además de uno cualquiera de la amplia variedad de ensayos que pueden realizarse por análisis de matrices de proteínas, genes y/o tejidos. Protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis por PCR). También pueden usarse inmunoensayos múltiple, tales como aquellos disponibles de Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery ("MSD").

Puede ensayarse la inhibición de la proliferación celular *in vitro* usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™, que está comercialmente disponible de Promega (Madison, WI). Ese ensayo determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Véanse Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, patente de EE.UU. N.º 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible al cribado de alto rendimiento automatizado (HTS). Véase Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento de ensayo implica añadir un único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas. Esto produce la lisis celular y la generación 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 al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos pueden registrarse por luminómetro o dispositivo de obtención de imágenes de cámara CCD. La salida de luminiscencia se expresa como unidades relativas de luz (URL).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado para su uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado para su uso en el tratamiento de cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c). En ciertas realizaciones, en el presente documento se proporciona el anticuerpo anti-FcRH5 (incluyendo anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c), comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-FcRH5 y/o inmunoconjungado. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c. En una realización tal, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporcionan usos de un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c). En una adicional realización, el medicamento es para su uso en un método de tratamiento de cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c), comprendiendo el método administrar a un individuo que tiene cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c-positiva) una cantidad eficaz del medicamento. En una realización tal, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de la isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento de cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c). En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene tal cáncer FcRH5-positiva (por ejemplo, FcRH5c) una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico contra FcRH5) y/o inmunoconjungado. En una realización tal, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe más adelante. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

Un cáncer FcRH5-positiva según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser, por ejemplo, trastorno proliferativo de linfocitos B FcRH5-positiva, neoplasia de células plasmáticas FcRH5-positiva y/o mieloma múltiple FcRH5-positiva. En algunas realizaciones, un cáncer FcRH5-positiva se detecta por immunohistoquímica anti-FcRH5 (IHC) o hibridación *in situ* (ISH). En algunas realizaciones, un cáncer FcRH5-positiva es un cáncer que expresa FcRH5 según un ensayo de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta ARNm de FcRH5. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa.

En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores, el individuo puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, en el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden

cualquiera de los anticuerpos anti-FcRH5 y/o inmunoconjuguado proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y/o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FcRH5 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y/o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y/o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento pueden usarse tanto solos como en combinación con otros agentes en una terapia. Tales terapias de combinación indicadas anteriormente engloban administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos están incluidos en la misma formulación o formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjuguado proporcionado en el presente documento puede producirse antes de, simultáneamente con, y/o tras, la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos y/o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento también pueden usarse en combinación con radioterapia.

Un anticuerpo (incluyendo anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjuguado proporcionado en el presente documento (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, que incluye, parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusions parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento diversos programas de dosificación que incluyen, pero no se limitan a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos de tiempo, administración en bolo e infusión por pulsos.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y/o inmunoconjugados proporcionados en el presente documento se formularían, dosificarían y administrarían de un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos para los profesionales médicos. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y/o inmunoconjuguado no necesitan ser formulados, pero opcionalmente se formulan, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjuguado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en el presente documento, o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjuguado proporcionados en el presente documento (cuando se usan solos o en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, el tipo de anticuerpo o inmunoconjuguado, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjuguado se administran para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoconjuguado, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjuguado se administran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 ug/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjuguado puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 ug/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento sería generalmente sostenido hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjuguado estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Así, pueden administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de forma que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones anteriores o métodos terapéuticos puede llevarse a cabo usando tanto un inmunoconjuguado proporcionado en el presente documento como un anticuerpo anti-FcRH5. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de

FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

H. Artículos de fabricación

- 5 En otro aspecto proporcionado en el presente documento, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas para solución IV, etc. Los recipientes pueden estar formados de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma, o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar el trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjungado proporcionado en el presente documento. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo contra FcRH5 (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) y/o inmunoconjungado de FcRH5 proporcionado en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en esta realización, proporcionado en el presente documento, puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcRH5 se unen al dominio 9 de tipo Ig de FcRH5c.

III. Ejemplos

- 30 Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas otras realizaciones pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Materiales y métodos

35 Inmunógeno (E11-flag)

- Se clonaron los aminoácidos 745-850 de FcRH5c humana (SEQ ID NO: 1) en el vector de expresión de mamífero pRK5.NT.Flag usando protocolos convencionales y se expresaron transitoriamente en células CHO. La proteína recombinante con marca de expresión Flag del extremo N se purificó usando anti-Flag y cromatografía de exclusión por tamaño en una columna S200 Superdex.

Desarrollo y caracterización de anticuerpos de ratón anti-FcRH5 E11

- 45 Se inmunizaron ratones Balb/c (Charles River, Hollister, CA) con 2 µg de proteína de ECD de FcRH5 E11 humana (restos de aminoácidos 743-850 de SEQ ID NO: 1) (Genentech, South San Francisco, CA) mezclada con adyuvante MPL+TDM (Ribi) mediante inyección plantar. Los ratones recibieron nueve dosis, seguido de un refuerzo por perfusión en PBS solo mediante vías plantar e IV tres días antes de la fusión.

- 50 Se recogieron los ganglios linfáticos poplíticos y linfocitos de estos ratones, todos cuyos sueros demostraron fuertes títulos de unión a la proteína de inmunización por ELISA y mostraron fuerte reactividad de FACS con células SVT2 transfectadas con el ECD de FcRH5 E11 humana, se fusionaron con células de mieloma de ratón X63-Ag8.653 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD) mediante electrofusión (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Se incubaron las células fusionadas a 37 °C, 7 % de CO₂, durante la noche en medio C (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), antes de la resuspensión en medio semi-sólido D (StemCell Technologies) que contenía 0,01 mg/ml de anti-IgG de ratón marcada con FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y se sembraron en bandejas Omniwell (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY). Nueve días después de la siembra, se seleccionaron colonias fluorescentes y se transfecaron en placas de 96 pocillos que contenían medio E (StemCell Technologies) usando un Clonepix FL (Genetix, New Milton, Hampshire, RU). Los sobrenadantes se criaron por ELISA contra anti-IgG de ratón (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) siete días después de la recogida.

- 60 Hibridomas que demuestran la expresión de IgG de ratón por ELISA se expandieron y criaron por FACS contra células SVT2 que expresaban en exceso FcRH5 humana de longitud completa, FcRH5 de cinc y ECD de FcRH5 E11 humana. Se subclonaron fuertes clones positivos por FACS por clasificación de una sola célula usando un FACSaria (BD, Franklin Lakes, NJ). Los clones finales que demostraron la unión de ELISA y de FACS más alta de interés después de una o dos rondas de subclonación se expandieron para la producción a gran escala en biorreactores (Integra Biosciences, Chur, Suiza). Entonces se purificaron los sobrenadantes por cromatografía de

afinidad de proteína A como se ha descrito previamente (Hongo et al., 2000).

Producción de bisFabs

Se generaron bisFab reticulando un Fab' del mAb anti-FcRH5 con un Fab' del mAb anti-CD3 (UCHT1.v9) en los restos de cisteína bisagra. Para generar los fragmentos Fab' 2 a partir de los Ab de hibridoma, se usaron diferentes condiciones de digestión: los Ab del isótipo mlgG1 se dirigieron con 1:50 (peso/peso) de pepsina a pH 3,5 durante 1-2 h a 37 °C.; los Ab IgG2a de ratón se dirigieron con lisina C endopeptidasa a una relación 1:500 (peso/peso), pH 8, durante 2-4 h a 37 °C; y los Ab IgG2b de ratón se dirigieron con lisina C a una relación 1:100 (peso/peso) durante la noche a 37 °C. En todos los casos el fragmento F(ab')₂ se aisló de la mezcla de reacción por captura con una columna SP y elución con 10 volúmenes de columna de un gradiente lineal (0-100 %) de cloruro sódico 1 M. Bajo las condiciones de digestión mencionadas anteriormente, mlgG1 y mlgG2b produjeron un fragmento F(ab')₂, que contenía tres restos de cisteína en la bisagra, mientras que F(ab')₂ de mlgG2a mostró dos restos de cisteína en la bisagra. Para generar Fab' con una única Cys reactiva, se usaron dos métodos diferentes. Para fragmentos que contenían un número impar (3) de cisteínas de bisagra (mlgG1 y mlgG2b), los F(ab')₂ aislados se redujeron en acetato sódico 25 mM, pH 5, cloruro sódico 150 mM, EDTA 2 mM, TCEP 2 mM durante 2-6 h a TA. Después de completarse la etapa de reducción, la muestra se diluyó a 0,2 mg/ml, el pH se aumentó a 7,5 añadiendo Tris a pH 8 y se añadió ácido deshidroascórbico 5 mM (DHAA) para conducir la re-oxidación de las cisteínas. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, se evaluó la presencia de tioles reducidos probando con un exceso de NEM y analizando el desplazamiento de MW por espectrometría de masas. Después de confirmarse la presencia de solo una cisteína reactiva por molécula, el Fab' se purificó por filtración en gel para eliminar pequeñas cantidades de homodímeros.

Para fragmentos F(ab')₂ derivados de mlgG2a y que contenían 2 restos de cisteína en la bisagra, se produjo una única cisteína reactiva por bloqueo parcial con N-etilmaleimida (NEM) como se describe en Scheer et al. (en prensa). Brevemente, el anticuerpo se dirigió con pepsina (1 % en peso/peso) mediante tratamiento en tampón acetato sódico a pH 4,5. Después de la digestión durante 1 hora, el F(ab')₂ se aisló de la mezcla de digestión por captura en una resina de intercambio catiónico SP-HP y se purificó por un gradiente de sal de 10 VC de NaCl 0-1 M. Entonces, el F(ab')₂ se redujo con TCEP 1 mM en un tampón que contenía MES 25 mM, pH 5,8, EDTA 2 mM y NaCl 300 mM y los Fab se oxidaron mediante la adición de ácido deshidroascórbico 5 mM (DHAA) para volver a formar el enlace disulfuro entre la cadena pesada y cadena ligera.

El brazo efecto de los bisFab (UCHT1.v9) se generó por digestión con pepsina, bloqueo con NEM parcial y conjugación con bismaleimida como se ha descrito antes (Scheer et al.; en prensa). Brevemente, los dos tioles (restos de cys) en la bisagra se hicieron reaccionar entonces con 1 equivalente de N-etilmaleimida (NEM) (Sigma Aldrich). Los diferentes Fab' anti-FcRH5 que contienen una única cisteína reactiva se incubaron con el Fab' anti-CD3 conjugado con el reticulante de bismaleimida durante la noche a temperatura ambiente. Los Fab reticulados de ~ 100 kDa se separaron de las especies sin reaccionar por filtración en gel y luego se caracterizaron por SDS-PAGE, espectrometría de masas y cromatografía analítica de exclusión por tamaño.

40 *Expresión y purificación de TDB*

Se produjeron TDB por dos enfoques diferentes: co-cultivo de bacterias que expresan cada uno de los dos brazos del anticuerpo o que expresan cada brazo por separado y luego hibridándolos *in vitro*. Las estrategias se han descrito en Christoph Spiess et al. 2012 y se describieron en el documento PCT/US10/58958 presentado el 31 de mayo de 2011. Brevemente, para la estrategia de co-cultivo, se cultivaron juntos *E. coli* que expresa anti-CD3 (ojal) y *E. coli* que expresa diana antitumoral (botón) en matraces con agitación a una relación predeterminada de forma que se produjeran cantidades similares de cada hemímero. Entonces se recogió el caldo bacteriano cocultivado, las células se rompieron en un microfluidizador y los anticuerpos se purificaron por afinidad por proteína A. Se ha observado que durante la microfluidización y captura de proteína A los dos brazos se hibridaron y formaron los puentes disulfuro intercatenarios de la bisagra (Christoph Spiess et al., 2012). Alternativamente, los hemímeros de anticuerpo se cultivaron por separado por fermentación celular de alta densidad y se aislaron independientemente por cromatografía de proteína A. Los hemímeros purificados fueron entonces combinados a una relación molar 1:1 y se incubaron en Tris 50 mM, pH 8,5, en presencia de DTT 2 mM durante 4 horas para permitir la hibridación y la reducción de disulfuros en la región bisagra. La diálsis contra el mismo tampón sin DTT durante 24-48 horas produjo la formación de los enlaces disulfuro intercatenarios. Para ambas estrategias de producción, el anticuerpo biespecífico se purificó de contaminantes por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) como se describe en Christoph Spiess et al. 2012. El material resultante se analizó para niveles de endotoxina usando un sistema de ensayo Endosafe portátil y cuando se necesitó, el contenido de endotoxina se redujo lavando la proteína con 0,1 % de Triton X-114.

60 *Caracterización de TDB*

Se analizó el peso molecular del anticuerpo biespecífico por espectrometría de masas (LC-ESI/TCF) como se ha descrito antes (Jackman et al., 2010). Los anticuerpos también se analizaron por cromatografía analítica de exclusión por tamaño en la columna Zenix SEC-300 (Sepax Technologies EE.UU.) usando un sistema de HPLC Agilent 1:100. La presencia de fragmentos de anticuerpos residuales se cuantificó por electroforesis usando 2100

Bioanalyser y Protein 230 Chip.

Fraccionamiento de glóbulos sanguíneos

- 5 Se separaron CMSP de la sangre de voluntarios sanos usando medio de separación de linfocitos (MP biomedicals, Solon, OH). Se extrajeron células CD8+ de CMSP usando el kit de aislamiento de CD8+ humanas de Miltenyi (N.º 130-094-156) por selección negativa.

Ensayos de citotoxicidad in vitro (destrucción de linfocitos T)

- 10 Para ensayos de citotoxicidad *in vitro*, se sembraron 1×10^4 células diana en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Se añadieron 3×10^4 linfocitos T CD8+ con o sin TDB o BisFab y se incubaron 48 horas a +37 °C. Se eliminaron los linfocitos T lavando dos veces con medio de crecimiento. Se midió la viabilidad celular usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI).

- 15 Alternativamente, se monitorizó la citotoxicidad *in vitro* por citometría de flujo. Se marcaron células diana con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) según el protocolo del fabricante (Invitrogen, N.º C34554). Se mezclaron células diana marcadas con CFSE y linfocitos T CD8+ purificados de CMSP humana en relación 3:1 de E:T y se incubaron con TDB o BisFab durante 48 horas. Al final de la incubación, las células se levantaron por tripsina y se recogieron de la placa. Las células se resuspendieron en volumen igual de PBS + 2 % de FBS + EDTA 1 mM + yoduro de propidio (PI). Se hizo análisis de citometría de flujo en un FACSCalibur en formato de automatización. Se contó el número de células diana vivas regulando en células CFSE+/PI negativas. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad del siguiente modo: % de citotoxicidad (número de células diana vivas sin TDB - número de células diana vivas con TDB) / (número de células diana vivas sin TDB) x 100.

25 *Análisis de activación de linfocitos T*

- 30 Se mezclaron células diana y linfocitos T CD8+ purificados en presencia o ausencia de TDB y se analizó la activación de linfocitos T por citometría de flujo. Al final de la incubación, las células se tiñeron con CD8-FITC (BD Biosciences, 555634) y CD69-PE (BD Biosciences, 555531).

Unión de sobrenadantes de subclones, anticuerpos monoclonales, bisFab y TDB

- 35 Para probar la unión a células cancerosas que expresan endógenamente FcRH5 o células cancerosas transfectadas con FcRH5, se levantaron células usando EDTA/PBS. Se suspendieron 1×10^5 células en 100 ul y se incubaron h con anticuerpos primarios (1 volumen de sobrenadante de subclones cuantificados no de IgG, 4 ug/ml de sobrenadante de subclones cuantificados de IgG o 2 ug/ml de anticuerpos monoclonales purificados). Las células se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS 1 % de BSA EDTA 2 mM) y se incubaron con dilución 1:1000 de secundario anti-ratón de cabra marcado con PE o 1:100 de anti-APC de ratón de cabra. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se hizo análisis de citometría de flujo en un FACSCalibur. Se hizo marcado con xenón directo de anticuerpos según el protocolo del fabricante (Invitrogen), cuando se indicara. Para analizar la unión a linfocitos NK o B, se incubó 1 millón de CMSP humanas con 4 ug/ml de sobrenadantes de subclones cuantificados de IgG durante 60 min, se lavaron y se incubaron con dilución 1:100 de secundario anti-ratón de cabra marcado con APC. Entonces, las células se lavaron otra vez dos veces y se tiñeron usando anti-CD56 (PE; BD Biosciences N.º 555516) y anti-CD19 (PE; BD Biosciences N.º 340364) antes de la citometría de flujo y los análisis de la unión a células CD56+ y CD19+ humanas.

Resultados

- 50 Inicialmente, para producir anticuerpos específicos de isoforma para el dominio de Ig proximal de la membrana, se inmunizaron ratones con proteína E11 producida de baculovirus recombinante (aminoácidos 745-848 de SEQ ID NO: 1) de FcRH5c humana y marca de expresión de His del extremo C). Esta estrategia de inmunización no produjo respuesta inmunitaria significativa a FcRH5 y dejó de producir anticuerpos anti-FcRH5 monoclonales. La segunda estrategia de inmunización fue inmunización de ADN con plásmido que codifica los aminoácidos 745-977 de FcRH5c (SEQ ID NO: 1) que codifican el dominio de Ig proximal de la membrana, dominio transmembranario y dominios intracelulares de FcRH5 humana. Esta estrategia de inmunización no produjo respuesta inmunitaria significativa a FcRH5 y dejó de producir anticuerpos anti-FcRH5 monoclonales. La tercera estrategia de inmunización utilizó péptidos correspondientes al dominio de Ig proximal de la membrana de FcRH5, que fueron homólogos a FcRH5 de cino y no homólogos a FcRH1, FcRH2, FcRH3 y FcRH4 humanas. Esta estrategia de inmunización no produjo respuesta inmunitaria significativa a FcRH5 y dejó de producir anticuerpos anti-FcRH5 monoclonales.

- 65 Para la cuarta estrategia de inmunización, se produjo proteína E11 en células CHO que consistían en el dominio de Ig proximal de la membrana de FcRH5 humana (restos de aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1) con marca de expresión Flag del extremo N. La proteína recombinante anterior se usó para inmunizar ratones. La inmunización, desarrollo y caracterización de anticuerpos anti-FcRH5 E11 de ratón se realizó como se ha descrito en detalle

anteriormente.

Después de 6 dosis de E11 recombinante (restos de aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1), se analizó el suero para la unión de FcRH5 a anticuerpos usando FACS. Se detectó reactividad significativa de células SVT2 que expresan FcRH5 de longitud completa humana, FcRH5 de longitud completa de cino, o el dominio transmembranario del dominio de E11 humano y dominios citoplásmicos, pero no las células SVT2 transfectadas con vector, que indica que los anticuerpos reactivos con FcRH5 estaban presentes en los sueros de los 5 ratones inmunizados.

Después de 9 dosis, se electrofusionaron linfocitos de los ratones inmunizados con células de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Se seleccionaron 323 subclones de hibridomas IgG-positiva para cribado adicional. Los clones se probaron para unirse a proteína E11 recombinante (restos de aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1) por ELISA (no mostrado) y la unión a células SVT2 que expresan FcRH5 de longitud completa humana, FcRH5 de longitud completa de cino o dominio transmembranario del dominio de E11 humano y dominios citoplásmicos de FcRH5 por FACS. Se identificaron un total de 26 clones que se unieron a células que expresan FcRH5 humana y células que expresan FcRH5 de cino, indicativo de reactividad de especies cruzada (Tabla 2). Se caracterizaron adicionalmente sobrenadantes de subclones para unirse a A) células de mieloma múltiple transfectadas con FcRH5 humana, B) células que expresan FcRH5 humana endógenamente (células de mieloma MOLP-2, linfocitos B CD19+ humanos periféricos de donantes sanos), C) células SVT2 transfectadas para expresar FcRH1, FcRH2, FcRH3 o FcRH4 humana, D) células 293 que expresan la versión truncada de FcRH5 humana (que carece de dominios 4 de Ig que incluyen E11; aminoácidos 464-850 de SEQ ID NO: 1) y E) linfocitos NK. Además, la unión de sobrenadantes a FcRH5a soluble se analizó por ELISA. Basándose en estos análisis, se seleccionaron anticuerpos monoclonales para la purificación.

Tabla 2.

Muestra	SVT2-huFcRH5	SVT2-cyFcRH5	SVT2-huE11
1B8	+++	++	++
4H8	+++	++	++
1H11	+++	++	+
4G8	++	+	+
4D4	+	+	+
1C8	+++	++	+
3C10	+++	++	++
3A4	+++	++	++
6D2	+++	+++	+
3G3	++	+	+++
1F4	++	+	+
3F10	++	+	+++
1G7	+++	++	++
3B12	++	+	+++
3G7	+++	++	+
5A10	+++	++	++
1C12	++	+	+
3D12	++	+	++
5H4	++	++	+
5H9	++	++	+++
3C5	++	++	+
2D10	+	+	+++
5B12	++	+	++
1H2	+	+	+
5F1	++	++	++
2H7	++	+++	++

La Figura 2 muestra el intervalo de dosis de la unión de cinco anticuerpos E11 purificados, anticuerpo anti-FcRH5 selectivo no de isoforma 10A8 (que se une a los dominios 4-5 de tipo Ig de FcRH5c) y un anticuerpo de control específico para la marca gD del extremo N a las células SVT2 que expresan ya sea FcRH5 humana (Figura 2A) o FcRH5 de cino (Figura 2B). Los anticuerpos en este ensayo se marcaron directamente con APC-fluoróforo según el protocolo del fabricante (Invitrogen N.º z25051, z25151, z25251). Se encontró que la unión del anticuerpo E11

25

30

representativo 5A10 a múltiples líneas de células de mieloma EJM (Figura 3A) y OPM2 (Figura 3B) transfectadas con FcRH5 humana era similar o mejor en comparación con los anticuerpos contra FcRH5 selectivos no de isoforma previamente descritos 10A8 y 7D11 (ambos se unen a los dominios 4-5 de tipo Ig de FcRH5c) (Elkins et al., 2012; Polson et al., 2006). Las células MOLP-2 son una de las muy pocas líneas de células de mieloma múltiple conocidas que expresan bajos niveles de FcRH5 endógenamente. Sobrenadantes de subclones 5A10, 5F1, 3G7 y 6D2 tuvieron células MOLP-2 con intensidad similar a 7D11 (Figuras 3C-F).

Se diseñaron dos pruebas separadas para tratar la dependencia de la unión sobre la presencia de dominio 9 de Ig proximal de la membrana (E11). Primero, se generó un mutante de FcRH5c humana truncada que carecía de los dominios 6-9 de Ig (aminoácidos 464-850 de SEQ ID NO: 1) que incluía el sitio de unión esperado para los anticuerpos derivados de la inmunización con E11. Esta construcción con marca gD del extremo N se expresó en células 293 y se sometió a 2,5 ug/ml de sobrenadantes de subclones, seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con PE (dilución 1:1000). Ninguno de los subclones probados se unió a células 293 que expresaban la FcRH5c humana truncada (Figura 4A). A diferencia, la unión se detectó para células 293 que expresaban FcRH5c humana no mutada. La unión de gD o clon de anticuerpo selectivo no de isoforma (10A8) no se alteró por la mutación. Este resultado demuestra que el sitio de unión de los anticuerpos contra E11 estaba incluido en los dominios 6-9 de Ig.

Se demostró además la selectividad por isoforma probando la unión a la isoforma de FcRH5a soluble. Para esto, se transfecaron células 293 para expresar la isoforma soluble con la marca de expresión HIS del extremo C. La expresión de la proteína FcRH5a se confirmó con análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-HIS. Se detectó una banda de 65 kD en medio acondicionado de FcRH5a, pero no células de vector transfectadas (no mostradas). Para el ELISA, se recubrieron placas con anticuerpo de captura anti-HIS y se incubaron 1 hora con medio acondicionado diluido 1:10 que incluía la isoforma FcRH5a soluble marcada con HIS. Se usaron los anticuerpos monoclonales contra E11 para la detección en 1 - 0,001 ug/ml de concentración, se incubaron durante 1 hora, seguido de incubación con anticuerpo de cabra anti-HRP de ratón y finalmente con sustrato de TMB. Mientras que los clones 2H7 y 5A10 demuestran reactividad considerable con FcRH5a soluble, los otros anticuerpos monoclonales probados no muestran ninguna unión detectable (Figura 5A). Este resultado confirma que el dominio 9 de Ig (E11) se requiere para la unión de los anticuerpos 1G7, 3A4, 3B12, 3G7 y 5F1, y, por tanto, estos anticuerpos son selectivos para la isoforma FcRH5 de longitud completa (FcRH5c).

FcRH5 se expresa endógenamente en linfocitos B (Hatzivassiliou et al., 2001; Polson et al., 2006). Para evaluar la unión de sobrenadantes de subclones a linfocitos B, se extrajeron CMSp de la sangre de donantes sanos. Se incubaron 1 millón de CMSp humanas con 4 ug/ml de sobrenadantes de subclones durante 60 min, se lavaron y se incubaron con dilución 1:100 de secundario de cabra anti-ratón marcado con APC. Entonces se lavaron las células otra vez dos veces y se tuvieron con anti-CD19 marcado con PE (BD Biosciences N.º 40364) antes de citometría de flujo y análisis de la unión a células CD19+. La mayoría de los sobrenadantes indujeron un desplazamiento significativo en la señal de APC en células CD19+ (Figura 5B) con respecto a los controles (sin anticuerpo primario, anti-gD) indicativo de la unión a linfocitos B.

Las moléculas de la familia de homólogos del receptor de Fc (FcRH) tienen un alto grado de homología entre sí (Miller et al., 2002). La homología es especialmente alta entre los dominios de la membrana proximal, que se dirigen a los anticuerpos contra E11 (Miller et al., 2002). Para investigar la reactividad cruzada con miembros de la familia, FcRH1, FcRH2, FcRH3 y FcRH4 (incluyendo todos una marca de expresión gD del extremo N), se expresaron en células SVT2 y las células se tuvieron con sobrenadantes de subclones y anticuerpo secundario de cabra anti-PE de ratón. La expresión de FcRH transfectada se confirmó por una señal de anticuerpo anti-gD en todas las líneas celulares. Ninguno de los sobrenadantes se unió significativamente a FcRH2 que expresa células en comparación con tinción con el anticuerpo gD (Figura 6B). 1B8, 1H11, 3C10, 4G8 y 6D2 demostraron un bajo nivel de la unión a FcRH1 (Figura 6A) y 1F4 se unió a FcRH4 (Figura 6D). En general, las señales de células SVT2 que expresan FcRH3 fueron bajas, que incluyen el anticuerpo de control gD, indicativo del bajo nivel de expresión. Se detectó el bajo nivel de la unión a células SVT2 que expresan FcRH4 para los sobrenadantes de 1F4 y 4H8 (Figura 6C).

Como la señal global en las células SVT2 que expresan FcRH3 era baja, se hicieron pruebas adicionales usando CMSp de donantes sanos. Las CMSp se tuvieron como se ha descrito anteriormente, pero en lugar de CD19 se usó CD56 (BD Biosciences N.º 555516) para regular la población de células investigadas para linfocitos NK. Linfocitos NK expresan endógenamente FcRH3 (Polson et al., 2006) y, como era de esperar, se tuvieron por un anticuerpo anti-FcRH3 monoclonal previamente descrito (Polson et al., 2006). La expresión de FcRH1 también se detectó en células CD56+, pero ninguno de los sobrenadantes del subclón E11 tuvo significativamente los linfocitos NK (Figura 7), demostrando la ausencia de reactividad cruzada con FcRH3 endógenamente expresada.

Se volvió a probar la reactividad cruzada de los miembros de la familia usando el protocolo idéntico descrito anteriormente en células SVT2, pero usando reactivos frescos y volviendo a transfectar las células SVT2 con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y FcRH4. Al volver a probar los anticuerpos purificados como se ha descrito anteriormente produjo resultados significativamente diferentes de la primera serie de experimentos. Estos resultados actualizados se resumen en la Tabla 4. En vez de mostrar de poca a ninguna reactividad cruzada con otros miembros de la familia de FcRH, todos excepto un anticuerpo (1G7) mostraron unión significativa a tanto FcRH5 como a al menos

uno o varios de otros miembros de la familia. Sin desear quedar ligado a teoría, esta cantidad de reactividad cruzada del anticuerpo es lo que cabría esperar, dada la similitud de secuencias del último dominio de tipo Ig en los diversos miembros de la familia de FcRH.

- 5 Los linfocitos T CD8+ están entre las células efectoras inmunitarias más potentes. La actividad de los linfocitos T puede ser reclutada para destruir células tumorales usando anticuerpos biespecíficos (o fragmentos de los anticuerpos) que se unen simultáneamente tanto a linfocito T como a un antígeno de tumor. La unión dual puede conducir a una activación polyclonal de linfocitos T y destrucción específica de células que expresan antígeno tumoral (Liu et al., 1985; Shalaby et al., 1992). Varias dianas tumorales y varias plataformas de anticuerpos biespecíficos han demostrado flexibilidad general y factibilidad preclínica para este enfoque. Y, lo que es más importante, se ha demostrado actividad clínica prometedora con un CD19 que se dirige al fragmento de anticuerpo scFv biespecífico activante de linfocitos T blinatumomab (MT103; MicroMet). El tratamiento con dosis de tan solo 60 ug/m²/día produce respuestas prolongadas en ensayos clínicos para el tratamiento de linfoma no Hodgkin recidivante y leucemia linfoblástica aguda (Bargou et al., 2008; Dreier et al., 2002)
- 10 15 Se investigó la capacidad de los anticuerpos contra FcRH5 para activar linfocito T y mediar en la destrucción en el formato de anticuerpo biespecífico generando moléculas bisFab biespecíficas. En resumen, estas moléculas biespecíficas se generan por escisión proteolítica del anticuerpo, seguido de reducción, reacciones de re-oxidación y conjugación de fragmentos Fab usando bismaleimida (Scheer et al., 2012b y como se ha descrito anteriormente). El 20 clon del anticuerpo anti-CD3 UCHT1 se une a CD3 humano que se incorpora al receptor de linfocitos T. Se ha mostrado previamente que UCHT1.v9 es un brazo de unión a linfocitos T eficiente (Junttila et al., 2012 y como se ha descrito anteriormente; Zhu et al., 1995) y, por tanto, se usó para los bisFab FcRH5. Se eligieron nueve clones de anticuerpos anti-FcRH5 (1G7, 2H7, 3G7, 5A10, 5F1, 6D2, 3B12, 3C10, 3F10) de la inmunización con E11 para el 25 brazo diana y se conjugaron con UCHT1.v9 para producir moléculas de bisFab biespecíficos CD3-FcRH5.
- 25 30 Además de las moléculas de bisFab, también se produjeron anticuerpos biespecíficos de longitud completa (anticuerpos biespecíficos dependientes de linfocitos T; TDB) usando la tecnología de botones en ojales (Merchant et al., 1998), que se basa en un par de regiones Fc manipuladas complementarias que conducen la heterodimerización de hemímeros de anticuerpo. Como en el caso de bisFab, se usó UCHT1.v9 (Zhu et al., 1995) como anti-CD3 (ojal). Para el brazo diana (botón), se usaron los clones de anticuerpo de la inmunización con E11 de FcRH5, un clon anti-FcRH5 selectivo no de isoforma (10A8) (Elkins et al., 2012) o clon anti-HER2 4D5 (trastuzumab) (Carter et al., 1992). Se ha descrito en detalle la generación y purificación de TDB (Junttila et al., 2012; Scheer et al., 2012a y como se ha descrito anteriormente).
- 35 40 45 50 Se investigó la capacidad de las moléculas biespecíficas para mediar en la destrucción de células diana 293 transfectadas con FcRH5 incubando las dianas con linfocitos T CD8+ (células efectoras) durante 48 horas y midiendo la actividad de destrucción usando el ensayo CellTiterGlo o el ensayo de destrucción de FACS (ensayos descritos anteriormente). Los nueve bisFab que incorporaron un brazo diana de E11 anti-FcRH5 fueron eficientes en mediar en la destrucción de células diana (FIG. 8A-B). Se detectó actividad de destrucción de concentraciones de tan solo 1-10 ng/ml y se saturó a 10-100 ng/ml de concentración. La máxima actividad de destrucción superó el 80 % para la mayoría de los clones. La actividad de destrucción fue similar en comparación con HER2-TDB (FIG. 8A-B). Se expresa HER2 humano en las células 293 a bajo nivel (datos no mostrados). A diferencia, la actividad de destrucción superó con creces la FcRH5-TDB selectiva no de isoforma (10A8), que era capaz de destruir solo aproximadamente el 20 % de las dianas (FIG. 8A-B). Se detectó actividad robusta similar usando un formato de TDB de longitud completa que incorporaba los clones de FcRH5-E11 2H7, 3G7 y 5A10 como brazos diana (FIG. 8C-D). No se detectó diferencia significativa entre las versiones de TDB y bisFab de 2H7 y 3G7, que indica que Fc no es necesario ni para la actividad ni es inhibitorio de la actividad destructora. bisFab de FcRH5 y TDB de longitud completa que incorporan 2H7 y 3G7 como brazo diana también fueron capaces de mediar eficientemente en la destrucción de células MOLP2, que expresan endógenamente bajos niveles de FcRH5 (FIG. 9A). La activación de linfocitos T fue seguida en las reacciones midiendo la proporción de células CD8+ que expresan CD69 en la membrana celular. La activación de linfocitos T se correspondió con la actividad de destrucción y fue similar para tanto bisFabs como TDB (FIG. 9B). Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Cion	Sedimento de Amigdulas por IHC	Moip2	SVT2/humana	SVT2/cino	SVT2/FcRH 1	SVT2/FcRH2	SVT2/FcRH3	SVT2/FcRH4	293/huFCRH5 WT	293/ Muñante	Linfocito B	Monocito	Linfocito NK	IRTA2a
1H2.2	-	-	+	+/-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1H2.5	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1F4.1	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-
1F4.2	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
1G7.2	-	-	++	++	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
1G7.4	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-
1C8.1	+	-	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	+/-
108.3	+	-	+	++	++	-	-	-	+	-	++	-	-	+/-
2H7.3	+	-	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	++
2H7.4	+	-	++	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	++
2D10.3	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	+
2D10.4	+	+	+	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3F10.2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-
3F10.7	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3A4.2	-	-	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	++
3A4.4	-	-	++	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	++
3G7.1	-	-	++	+	++	-	-	-	+	-	+	-	-	+
3B12.1	+	+	++	++	++	-	-	-	+	-	++	-	-	-
3B12.2	+	+	+	++	+	-	-	-	+	-	++	-	-	-
4G8.1	+	-	+	++	++	+/-	-	-	+	-	+	-	-	-
5F1.1	-	-	++	++	++	-	-	-	+/-	-	+	-	-	-
5F1.2	-	-	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	-
5A10.1	+	+	++	++	++	-	-	-	+	-	++	-	-	++
6D2.2	-	-	++	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	+
3G3.5	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3G3.7	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3C10.3	+	+	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	+
3C10.4	+	+	+	++	++	-	-	-	+	-	+	-	-	+

Tabla 4

Clon	SVT2/FcRH1	SVT2/FcRH2	SVT2/FcRH3	SVT2/FcRH4	SVT2/FcRH5
1G7.2.mlgG1	-	-	-	-	+++
2H7.3.mlgG2b	-	+++	+++	-	+++
3G7.1.mlgG2a	-	++	+++	-	+++
5F1.1.mlgG2a	+/-	+/-	+++	-	+++
5A10.1.mlgG2b	-	+++	+++	-	+++
3B12.1.mlgG2b	-	-	+++	-	+++
3A4.2.hlgG1	-	++	+++	-	+++
6D2.2.hlgG1	-	+++	++	-	+++
1C8.1.hlgG1	-	++	+++	-	+++
3C10.3.hlgG1	+++	+/-	-	-	+++
3F10.7.hlgG1	-	-	++	-	++

Referencias

- 5 Bargou, R. et al. (2008). Science 321, 974-977.
 Carter, P. et al. (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89, 4285-4289.
 Dreier, T. et al. (2002). Int J Cancer 100, 690-697.
 Elkins, K. et al. (2012). Mol Cancer Ther 11, 2222-2232.
 Hatzivassiliou, G. et al. (2001). Immunity 14, 277-289.
- 10 Liu, M. A. et al. (1985). Proc Natl Acad Sci U S A 82, 8648-8652.
 Merchant, A. M. et al. (1998). Nat Biotechnol 16, 677-681.
 Miller, I et al. (2002). Blood 99, 2662-2669.
 Polson, A. G. et al. (2006). Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. International immunology 18, 1363-1373.
- 15 Shalaby, M. R. et al. (1992). J Exp Med 175, 217-225.
 Zhu, Z. et al. (1995). Int J Cancer 62, 319-324.

Dominio variable de la cadena ligera

20 1C8.1

DIVMTQSQRFMSTSLGDRVSVTCKASQNVITNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYTNPWMWTFGGGTRLEIKRTVA (SEQ ID NO:110)

25 1G7.2

DIVMTQSHKIMSTSVGDRVSITCKASQDVSNIVWFQQKPGQSPNLLIYSASYRYTGPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTKEIKRTVAA (SEQ ID NO:112)

30 2H7.3

EIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQNRNNLHWYQQKSHESPRLLIKFTSQSISGIPSRTGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMYFCQQSNWPQYTFGGGTKEIKRTVAA (SEQ ID NO:114)

35 3A4.2

DIQMTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIISGIPSRTGSGSGTDFTLSINSVETE DFGMYFCQQSNWPQYTFGGGTKEIKRTVAA (SEQ ID NO:116)

40 3B12.1.1

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSNLAWYQLKQGKSPQLLVYGAANLAEGVPSRISGSGSGTQYSLKINSLQ SEDFGTYYCQHFWGIPWTFGGGTKEIKRTVAA (SEQ ID NO:118)

3C10

DIQMTQTPLSLPVTLDQASISCRSSQLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:120)

5 3F10

DIVMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSNLAWYQLKQGKSPQLLVYGAANLAEGVPSRISGSGSGTQYSLKINSLQ
SEDFGTYYCQHFWGIPWTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:122)

10 3G3

DIVMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSNLAWYQLKQGKSPQLLVYGAANLAEGVPSRISGSGSGTQYSLKINSLQ
SEDFGTYYCQHFWGIPWTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:124)

15 3G7.1.5

DIVLIQSPATLSVTLGGSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIISGIPSFRGSGSGTDFTLTINSVETED
FGIYFCQQSNNWPQYTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:126)

20 5A10.1.3

DIVLTQSPANLSVIPGDSVSLSCRASQNIIRNNLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSMSGTPSRFTGSGSGTDFTLTINTVE
TEDFGMYFCQQSNNWPQYTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:128)

25 5F1.1.5

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGVTSNFANWVQEKPDLFTGLIGGTSNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT
GAQTEDEAIYFCVLWCSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAA (SEQ ID NO:130)

30 6D2

DIVMTQSHKFMSITVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIFWPSTRHTGVPDFRTGSGSGTDFTLTIG
NVQSEDLADYFCQQFSSLPHFTFGGGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:132)

35 1G7'

DIVMTQSHKIMSTSVDGRVSITCKASQDVSNIVWFQQKPGQSPNLLIYSASYRTGVPDFRTGSGSGTDFTFTISSV
QAEDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTLEIK (SEQ ID NO:134)

Dominio variable de la cadena pesada

40 1C8.1

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCEASGYSFTAYIMNWVKQSRGKNLEWIGLINPYNGETTYNQFKKGKATLTVVDQSS
TAYMELLSLTSEDAVYFCARGLYWFPYWQGTLTVSAASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:111)

45 1G7.2

EVQLQESGPLVQPSQSLSITCTVSGFSLTRFGVHWVRQSPGKGLEWLGIWRGGSTDYNAAFMSRLITKDNSKS
QVFFKLNSLKVDATIYYCSNHYYGSSDYALDNWGQGTSVTSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:113)

2H7.3

EVQLQQSGPELWKPGASVKMSCKASGYFTDYYMKWVKQTHGKSLEWIGDINPNNGETFYSQKFKKGKATLTVDKS
STTAYMQLNSLTSEDAVYYCARGLYRFDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:115)

45 3A4.2

ES 2 962 874 T3

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGETFYNQKLKGATLTVDKSS
NTVFMQLNSLTSEDSAVYYCARGLYFFAYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:117)

3B12.1.1

5 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLERIGGINPNNDAVSYNQRFRGATLTVDKSSST
AYMELRSLTSEDSAVYYCAKLGRGYYFDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:119)

3C10

10 QVQLQQPGAEVRPGASVKLSCKTSGYTFISYWVINWKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDATLTVDTSSS
TAYMQLTSPTESEDSAVYYCTRSLYGYDASYFDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:121)

3F10

15 QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLERIGGINPNNDAIYSYNQKFRGATLTVDKSSSTA
YMELRSLTSEDSAVYYCAKLGRGYYFDYWGRTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:123)

15 3G3

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLERIGGINPNNDAIYSYNQKFRGATLTVDKSSSTA
YMELRSLTSEDSAVYYCAKLGRGYYFDYWGRTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:125)

20 3G7.1.5

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVRQNHGKRLEWIGDINPYNGDTFYNQKFKDATLTVDKS
SSTAYMQFNSLTSEDSAVYYCARGLYFFHYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:127)

25 5A10.1.3

EVQLQQSGPELWKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGETFYNQFKKGATLTVDKS
TSTAYMELNSLTTEDSAVYYCARGLYRFDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:129)

5F1.1.5

30 QVQLQQSGADLVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEFKKGATLTADKSS
STAYMQLSSLTSDDSAVYYCARGLYRFDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:131)

6D2

35 QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGFSFTAYFMNWVKQSHGKSPEWIGRINPYNGETFFNQNFKDKATLTVDKSS
NTAHMELLSLTSDDSAVYYCGRGLYYLNYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:133)

1G7'

40 QVQLKQSGPGLVQPSQLSITCTVSGFSLTRFGVHWVRQSPGKGLEWLGVIRGGSTDYNAAFMSRLITKDNSKS
QVFFKLNSLKVDATIYYCSNHYYGSSDYALDNWGQGISVTVSS (SEQ ID NO:135)

Kabat CDR L1 (HVR-L1)

ES 2 962 874 T3

		24		25		26		27		27A		27B		27C		27D		27E		27F		28		29		30		31		32		33		34		SEQ ID NO:
1C8.1	K	A	S	Q	N	V	.	.	T	N	V	A	2																
1G7.2	K	A	S	Q	D	V	S	.	N	I	V	V	3																
2H7.3	R	A	S	Q	N	I	R	.	N	N	L	H	4																
3A4.2	R	A	S	Q	S	I	S	N	N	L	H	5																	
3B12.1.1	R	A	S	E	N	I	Y	S	N	L	A	6																	
3C10	R	S	S	Q	S	L	V	H	R	.	.	N	G	N	T	Y	L	H	7																	
3F10	R	A	S	E	N	I	Y	S	N	L	A	8																	
3G3	R	A	S	E	N	I	Y	S	N	L	A	9																	
3G7.1.5	R	A	S	Q	S	I	S	N	N	L	H	10																	
5A10.1.3	R	A	S	Q	N	I	R	N	N	N	L	H	11																
5F1.1.5	R	S	S	T	G	T	V	T	T	S	N	F	A	N	12																	
6D2	K	A	S	Q	D	V	G	T	A	V	A	13																	

Kabat CDR L2 (HVR-L2)

	50	51	52	53	54	54A	54B	54C	54D	54E	55	56	SEQ ID NO:
1C8.1	S	A	S	Y	R	Y	S	14
1G7.2	S	A	S	Y	R	Y	T	15
2H7.3	F	T	S	Q	S	I	S	16
3A4.2	F	A	S	Q	S	I	S	17
3B12.1.1	G	A	A	N	L	A	E	18
3C10	K	V	S	N	R	F	S	19
3F10	G	A	A	N	L	A	E	20
3G3	G	A	A	N	L	A	E	21
3G7.1.5	F	A	S	Q	S	I	S	22
5A10.1.3	F	A	S	Q	S	M	S	23
5F1.1.5	G	T	S	N	R	A	P	24
6D2	W	P	S	T	R	H	T	25

5

Kabat CDR L3 (HVR-L3)

	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	95D	95E	95F	96	97	SEQ ID NO:
1C8.1	Q	Q	Y	T	N	Y	P	M	W	T	26
1G7.2	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T	27	
2H7.3	Q	Q	S	N	N	W	P	Q	Y	T	28	
3A4.2	Q	Q	S	N	N	W	P	Q	Y	T	29	
3B12.1.1	Q	H	F	W	G	I	P	W	T	30	
3C10	S	Q	S	T	H	V	P	P	T	31	
3F10	Q	H	F	W	G	I	P	W	T	32	
3G3	Q	H	F	W	G	I	P	W	T	33	
3G7.1.5	Q	Q	S	N	N	W	P	Q	Y	T	34	
5A10.1.3	Q	Q	S	N	N	W	P	Q	Y	T	35	
5F1.1.5	V	L	W	C	S	N	L	W	V	36	
6D2	Q	Q	F	S	S	L	P	H	T	37	

10

Kabat CDR H1 (HVR-H1)

ES 2 962 874 T3

		31		32		33		34		35		35A		35B		SEQ ID NO:
1C8.1	A	Y			M		N	38	
1G7.2	R	F	G	V	H	39	
2H7.3	D	Y	Y	M	K	40	
3A4.2	D	Y	Y	M	K	41	
3B12.1.1	E	Y	T	I	H	42	
3C10	S	Y	W	I	N	43	
3F10	E	Y	T	I	H	44	
3G3	E	Y	T	I	H	45	
3G7.1.5	D	Y	Y	M	K	46	
5A10.1.3	D	Y	Y	M	K	47	
5F1.1.5	N	Y	L	I	E	48	
6D2	A	Y	F	M	N	49	

CDR H1 (HVR-H1)

		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35A	35B	SEQ ID NO:
1C8.1	G	Y	S	F	T	A	Y	M	N	50
1G7.2	G	F	S	L	T	R	F	G	V	H	.	.	.	51
2H7.3	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	K	.	.	.	52
3A4.2	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	K	.	.	.	53
3B12.1.1	G	Y	T	F	T	E	Y	T	I	H	.	.	.	54
3C10	G	Y	T	F	I	S	Y	W	I	N	.	.	.	55
3F10	G	Y	T	F	T	E	Y	T	I	H	.	.	.	56
3G3	G	Y	T	F	T	E	Y	T	I	H	.	.	.	57
3G7.1.5	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	K	.	.	.	58
5A10.1.3	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	K	.	.	.	59
5F1.1.5	G	Y	A	F	T	N	Y	L	I	E	.	.	.	60
6D2	G	F	S	F	T	A	Y	F	M	N	.	.	.	61

5

Kabat CDR H2 (HVR-H2)

	50	51	52	52A	52B	52C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	SEQ ID NO:
1C8.1	L	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	62
1G7.2	V	I	W	.	.	.	R	G	G	S	T	D	Y	N	A	A	F	M	S	63
2H7.3	D	I	N	P	.	.	N	N	G	E	T	F	Y	S	Q	K	F	K	G	64
3A4.2	D	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	F	Y	N	Q	K	L	K	G	65
3B12.1.1	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	V	S	Y	N	Q	R	F	R	G	66
3C10	N	I	Y	P	.	.	S	D	S	Y	T	N	Y	N	Q	K	F	K	D	67
3F10	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	I	S	Y	N	Q	K	F	R	G	68
3G3	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	I	S	Y	N	Q	K	F	R	G	69
3G7.1.5	D	I	N	P	.	.	Y	N	G	D	T	F	Y	N	Q	K	F	K	D	70
5A10.1.3	D	I	N	P	.	.	N	N	G	E	T	F	Y	N	Q	K	F	K	G	71
5F1.1.5	V	I	N	P	.	.	G	S	G	G	T	N	Y	N	E	K	F	K	G	72
6D2	R	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	F	F	N	Q	N	F	K	D	73

10

CDR H2 (HVR-H2)

ES 2 962 874 T3

	49	50	51	52	52A	52B	52C	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	SEQ ID NO:
1C8.1	G	L	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G
1G7.2	G	V	I	W	.	.	.	R	G	G	S	T	D	Y	N	A	A	F	M	S
2H7.3	G	D	I	N	P	.	.	N	N	G	E	T	F	Y	S	Q	K	F	K	G
3A4.2	G	D	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	F	Y	N	Q	K	L	K	G
3B12.1.1	G	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	V	S	Y	N	Q	R	F	R	G
3C10	G	N	I	Y	P	.	.	S	D	S	Y	T	N	Y	N	Q	K	F	K	D
3F10	G	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	I	S	Y	N	Q	K	F	R	G
3G3	G	G	I	N	P	.	.	N	N	D	A	I	S	Y	N	Q	K	F	R	G
3G7.1.5	G	D	I	N	P	.	.	Y	N	G	D	T	F	Y	N	Q	K	F	K	D
5A10.1.3	G	D	I	N	P	.	.	N	N	G	E	T	F	Y	N	Q	K	F	K	G
5F1.1.5	G	V	I	N	P	.	.	G	S	G	G	T	N	Y	N	E	K	F	K	G
6D2	G	R	I	N	P	.	.	Y	N	G	E	T	F	F	N	Q	N	F	K	D

Kabat CDR H3 (HVR-H3)

	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	100K	100L	100M	SEQ ID NO:	
1C8.1	G	L	Y	W	F	P	Y
1G7.2	H	Y	Y	G	S	S	D	Y	A	L	D	N	
2H7.3	G	L	Y	R	F	D	Y	
3A4.2	G	L	Y	F	F	A	Y	
3B12.1.1	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y	
3C10	S	L	Y	G	Y	D	A	S	Y	F	D	Y	
3F10	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y	
3G3	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y	
3G7.1.5	G	L	Y	F	F	H	Y		
5A10.1.3	G	L	Y	R	F	D	Y		
5F1.1.5	T	R	N	Y	G	Y	V	I	D	Y		
6D2	G	L	Y	Y	N	N	Y		

5

CDR H3 (HVR-H3)

	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	100K	100L	100M	SEQ ID NO:
1C8.1	A	R	G	L	Y	W	F	P	Y		
1G7.2	S	N	H	Y	Y	G	S	S	D	Y	A	L	D	N	
2H7.3	A	R	G	L	Y	R	F	D	Y			
3A4.2	A	R	G	L	Y	F	F	A	Y			
3B12.1.1	A	K	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y		
3C10	T	R	S	L	Y	G	Y	D	A	S	Y	F	D	Y		
3F10	A	K	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y		
3G3	A	K	L	G	R	G	Y	Y	F	D	Y		
3G7.1.5	A	R	G	L	Y	F	F	H	Y				
5A10.1.3	A	R	G	L	Y	R	F	D	Y				
5F1.1.5	A	R	T	R	N	Y	G	Y	V	I	D	Y			
6D2	G	R	G	L	Y	Y	L	N	Y			

10

FcRH5c

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVLTCKGFRFYSPQTKWYHRYLG
KEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGLDSVLCRAKAE
VTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIPHACKDNGAYRCTGYKESCCPSSNTVKIQVQEPFTR
PVLRASSFQPISGNPVTLCETQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWSLSPNFQITAMWSKDS
GFYWCKAATMPYSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEGTKVTLHCETQEDSLRTL
YRFYHEGVPLRHKSVCERGASISFLTTENSGNYYCTADNGLGAKPSKA VSLSVTVPVSHPV
LNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEGAALERRSANSAGGVAISFSLTAEHSGN
YYCTADNGFGPQRSKAVSLSVTVPVSHPVLTSSAEALTTFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFY
HEDMPLWSSSTPSVGRVSFSLTEGHSGNYYCTADNGFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRV
PRAQAVVGDLLEHCEAPRGSPPILYWFYHEDVTLGSSAPSNGEASFNLSLTAEHSGNYSCE
ANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRIPIFTRAPRAQAVVGDLLEHCEALRGSSPILYWFYHEDVT
LGKISAPSGGGASFNLSLTTEHSGIYSCeadngleaqrsemvtkvavpvsrpvltlapgth
AAVGDLLEHCEALRGSPILYRFFHEDVTLGNRSSPSGGASNLSTAEHSGNYSCEADNGL
GAQRSETVTLYITGLTANRSGPFATGVAGGLLSIAGLAAGALLYCWLSRKAGRKPASDPARS
PSDSDSQEPTYHNVPaweelqpvytnanprgenvysevriiqekkkhavasdprhlnkgs
PIIYSEVKVASTPVGSLFLASSAPHR (SEQ ID NO:1)

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende:
 - 5 (a) un anticuerpo anti-FcRH5 que se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c y no se une significativamente a otro dominio de tipo Ig de FcRH5, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se produce mediante un método que comprende las etapas de:
 - 10 (i) cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-FcRH5 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-FcRH5; y
 - (ii) recuperar el anticuerpo anti-FcRH5 de la célula hospedadora o del medio de la célula hospedadora, en donde la región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c se selecciona del grupo que consiste en:
 - 15 (I) aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1;
 - (II) aminoácidos 745-851 de SEQ ID NO: 1;
 - (III) aminoácidos 752-834 de SEQ ID NO: 1; y
 - (IV) los aminoácidos 754-835 de la SEQ ID NO: 1; y
- 20 (b) un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un agente terapéutico adicional.
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c mostrada como los aminoácidos 745-850 de SEQ ID NO: 1.
4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c mostrada como los aminoácidos 745-851 de SEQ ID NO: 1.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c mostrada como los aminoácidos 752-834 de SEQ ID NO: 1.
- 35 6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 se une a una región específica de isoforma c del dominio extracelular de FcRH5c mostrada como los aminoácidos 754-835 de SEQ ID NO: 1.
- 40 7. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 es:
 - 45 (a) un anticuerpo monoclonal;
 - (b) un anticuerpo humano, humanizado o químérico;
 - (c) un fragmento de anticuerpo que se une a FcRH5;
 - (d) un anticuerpo IgG1, IgG2a, o IgG2b;
 - (e) un anticuerpo biespecífico; y/o
 - (f) está conjugado con una marca, en donde opcionalmente la marca es un emisor de positrones, y opcionalmente el emisor de positrones es ^{89}Zr .
- 50 8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo biespecífico se une a FcRH5 y CD3.
9. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo anti-FcRH5 tiene una o más de las siguientes características:
 - 55 (a) reacciona de forma cruzada con FcRH5 humana y de cinco de longitud completa;
 - (b) no presenta reacción cruzada con FcRH1, FcRH2, FcRH3 y/o FcRH4;
 - (c) se une a FcRH5 endógena; y
 - (d) no presenta reacción cruzada con FcRH5a.
- 60 10. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer FcRH5-positiva, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica.
- 65 11. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 10, en donde el cáncer FcRH5-positiva es un trastorno proliferativo de linfocitos B.

12. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 11, en donde el trastorno proliferativo de linfocitos B es una neoplasia de células plasmáticas.
- 5 13. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 12, en donde la neoplasia de células plasmáticas es mieloma múltiple.

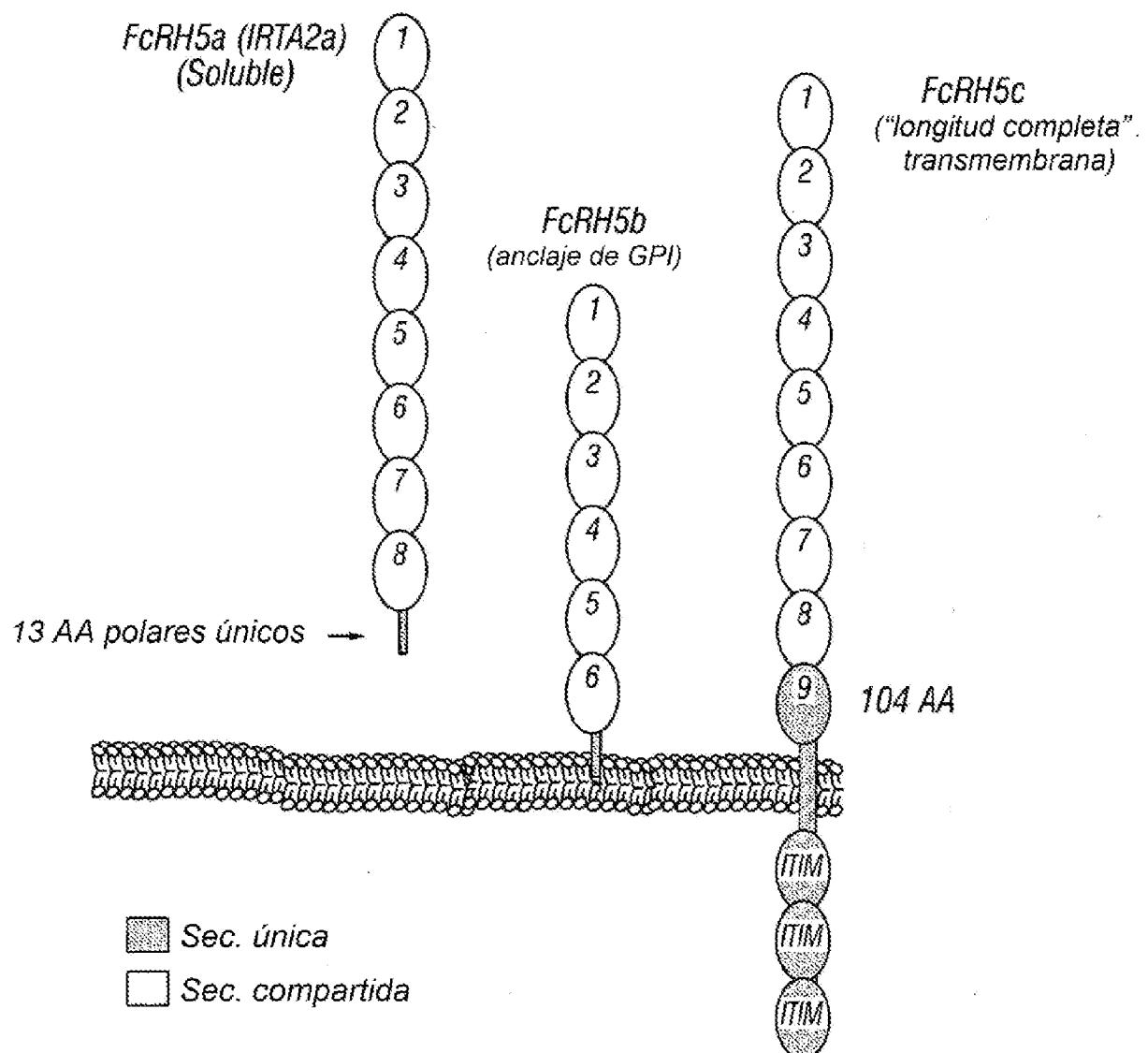


FIG. 1A

Estructura y homología de los aminoácidos de FcRH5 735 a 977

Enlace disulfuro

*

*	*	*	*
---	---	---	---

*

1 VAVPVSRPVL TURAPCTHAA VGDLEELACE ALRGSPLLY RFFIEDVTLG RSSPSSGAS IMSI_{TM}AHS GNSCEADNG LGACRSETVT LYITGILHNR
 101 SEPFATGAG GILSTAGLAA GALLIYCHS RKAGRKPASD PARSPSDSDS QEPTYHNPA WEEIOPVYTNA PRGENVY SEVLIQEKX KHAVASDPRRA
 Dom^o ATM

201 LRNKGSPLLY SEVKVASTPV SGSEFLASSA PHR

* Possible sitio de glucosilación unido a N

FIG. 1B

SVT2/huFCRH5 FL

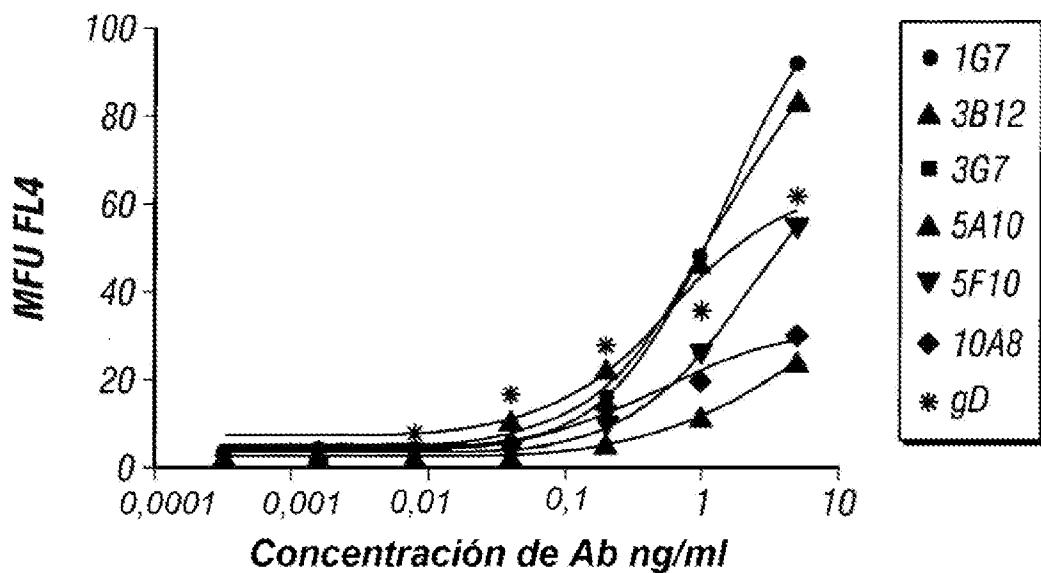


FIG. 2A

SVT2/cy FCRH5

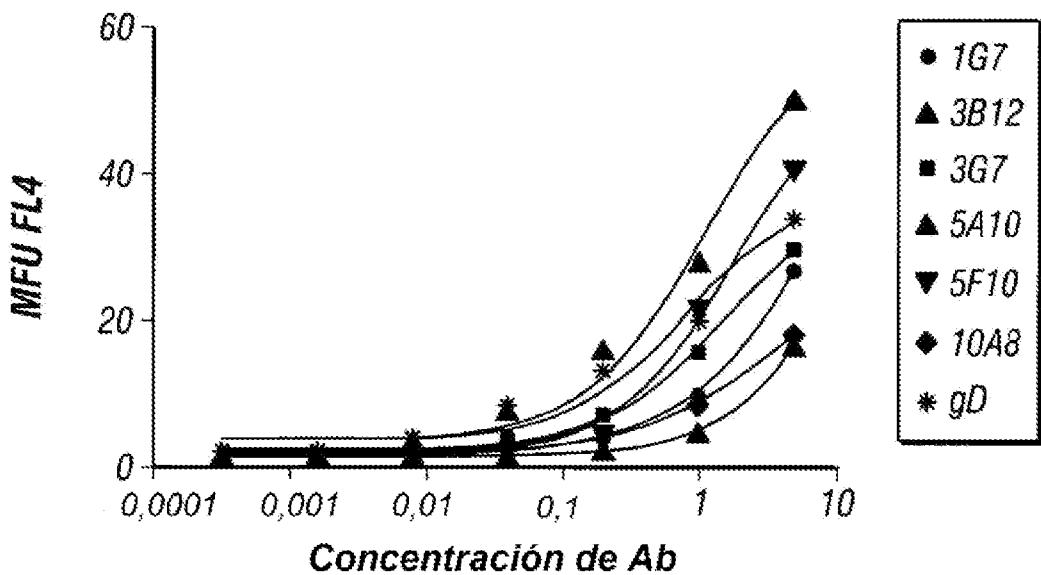


FIG. 2B

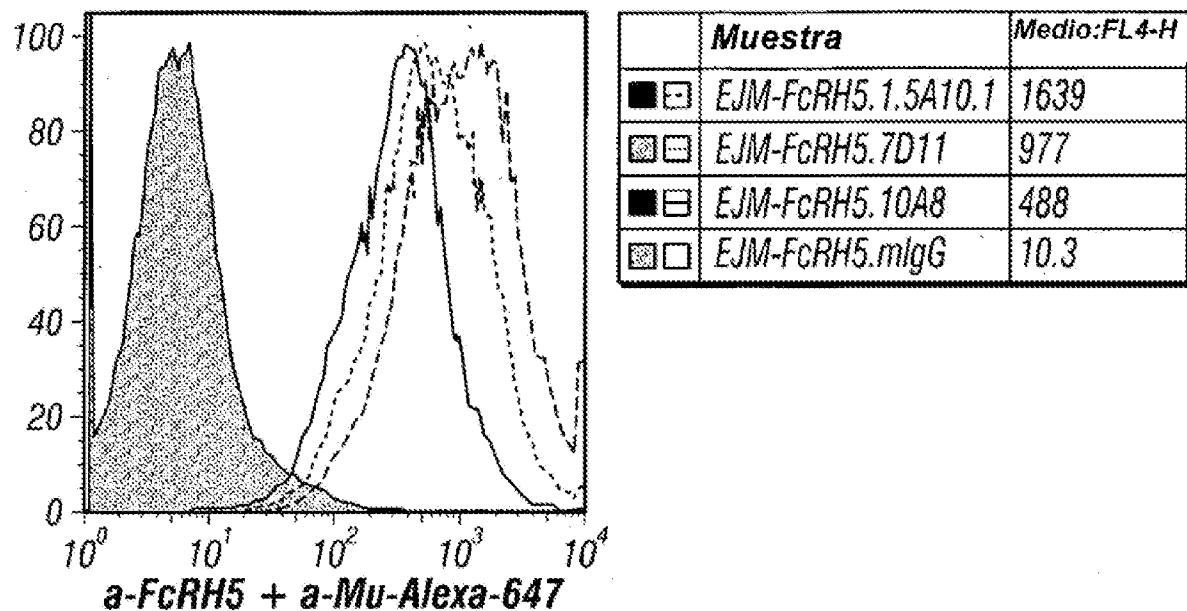


FIG. 3A

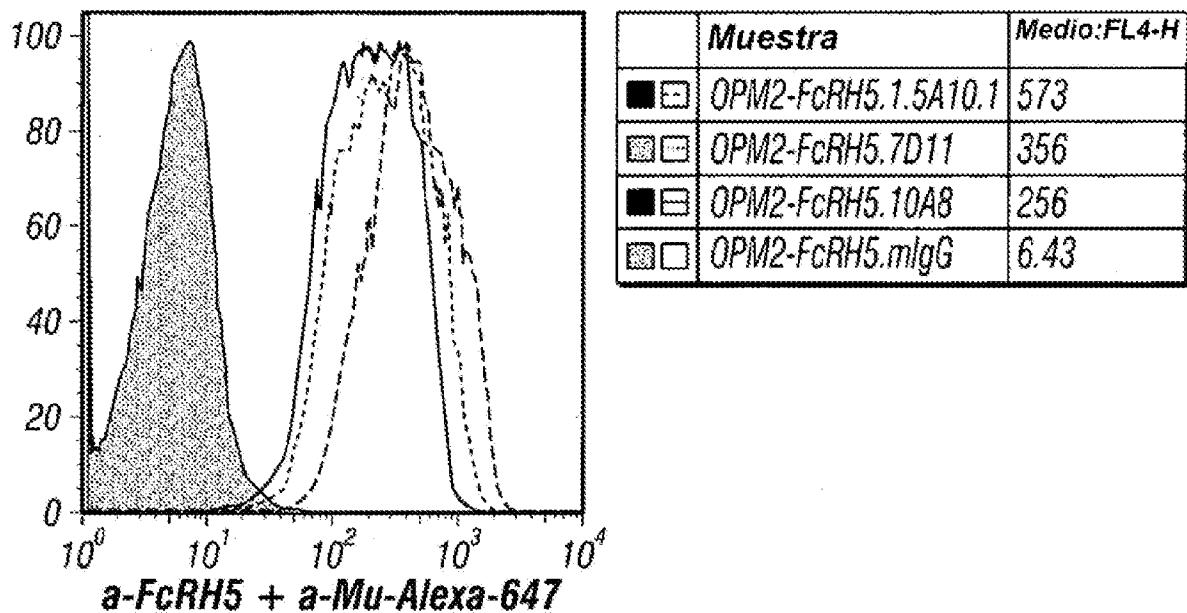
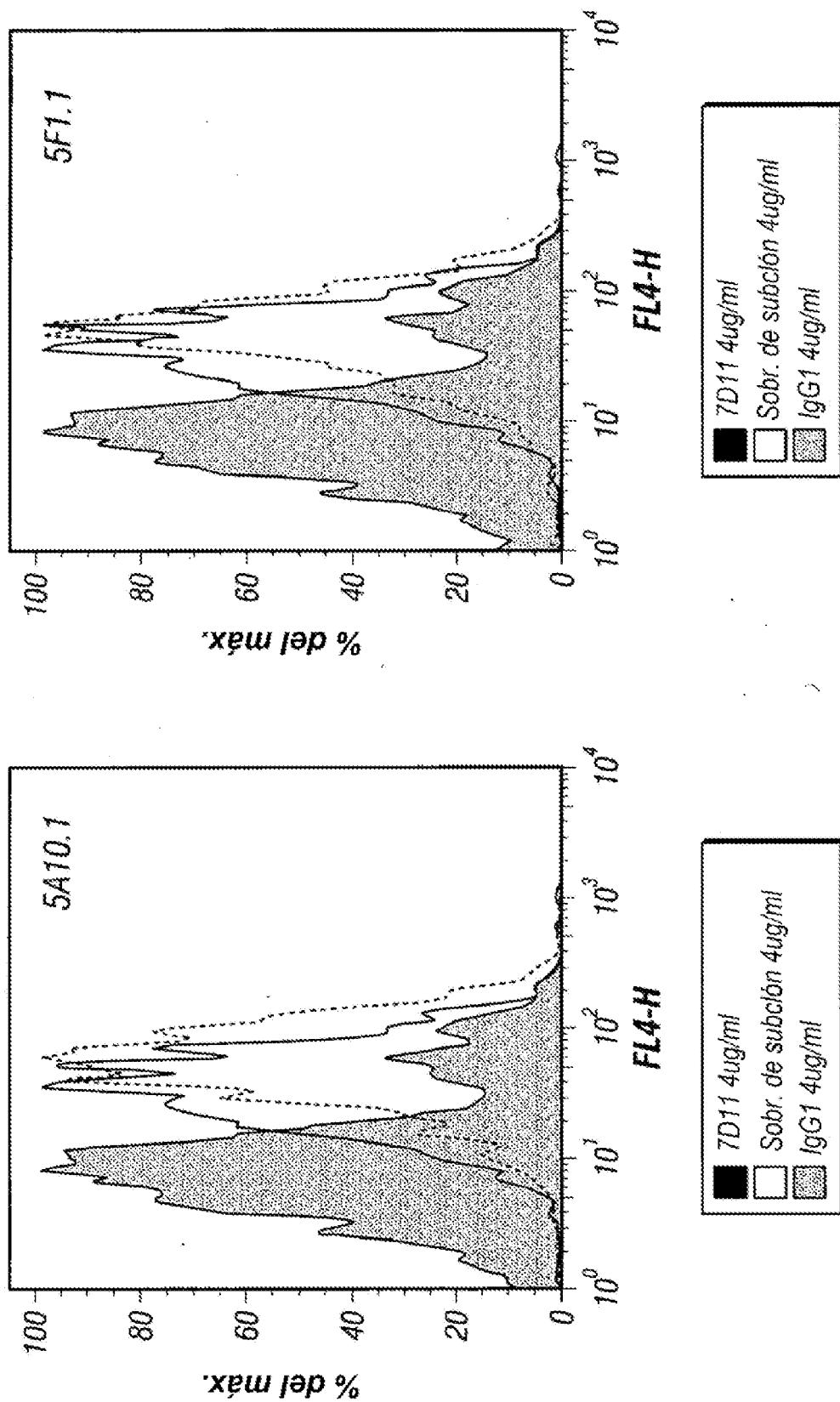


FIG. 3B

**FIG. 3D****FIG. 3C**

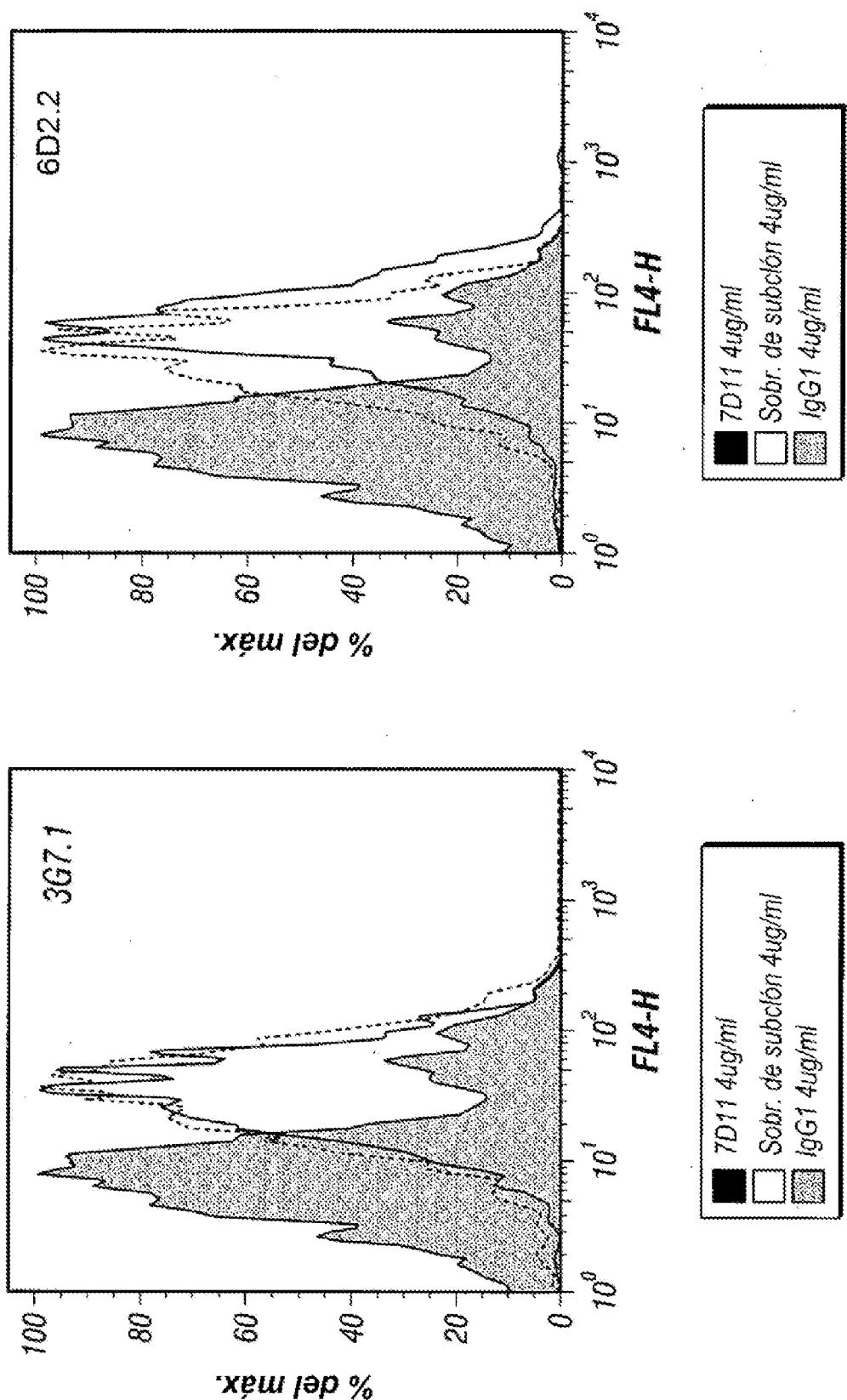


FIG. 3F

FIG. 3E

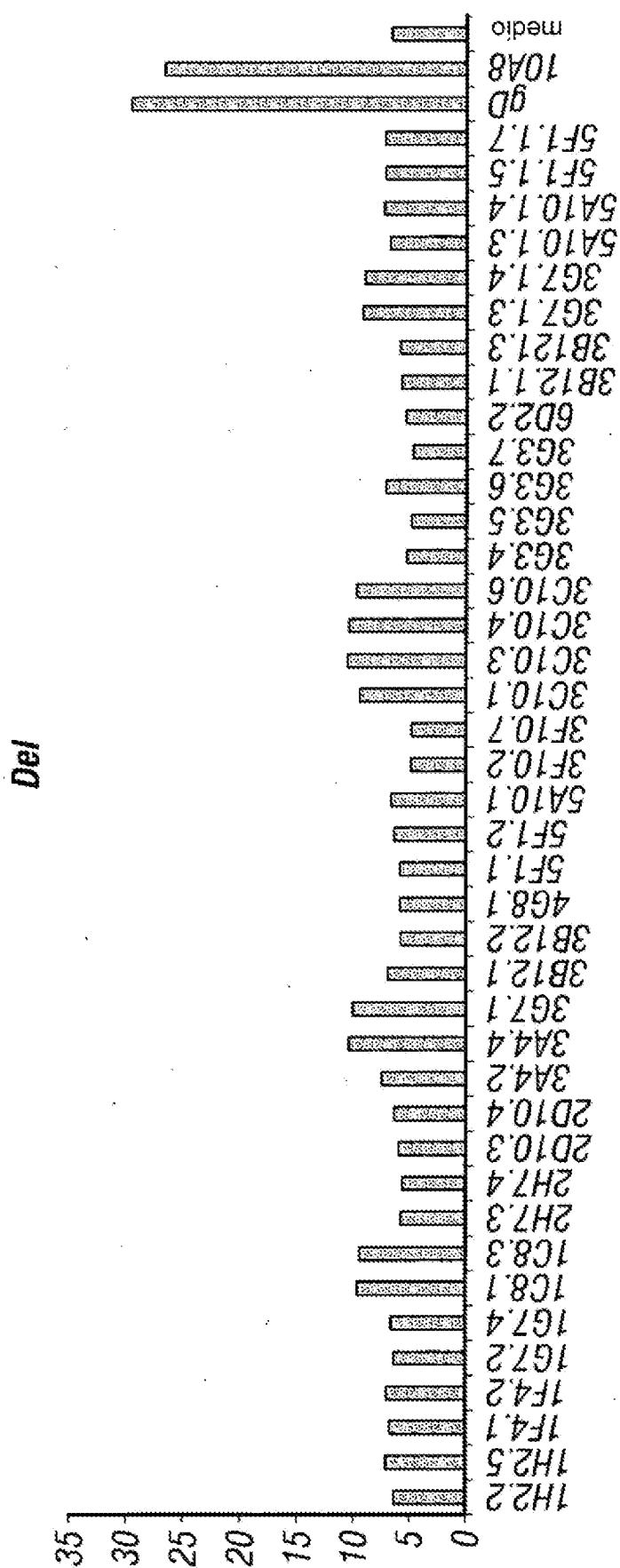


FIG. 4A

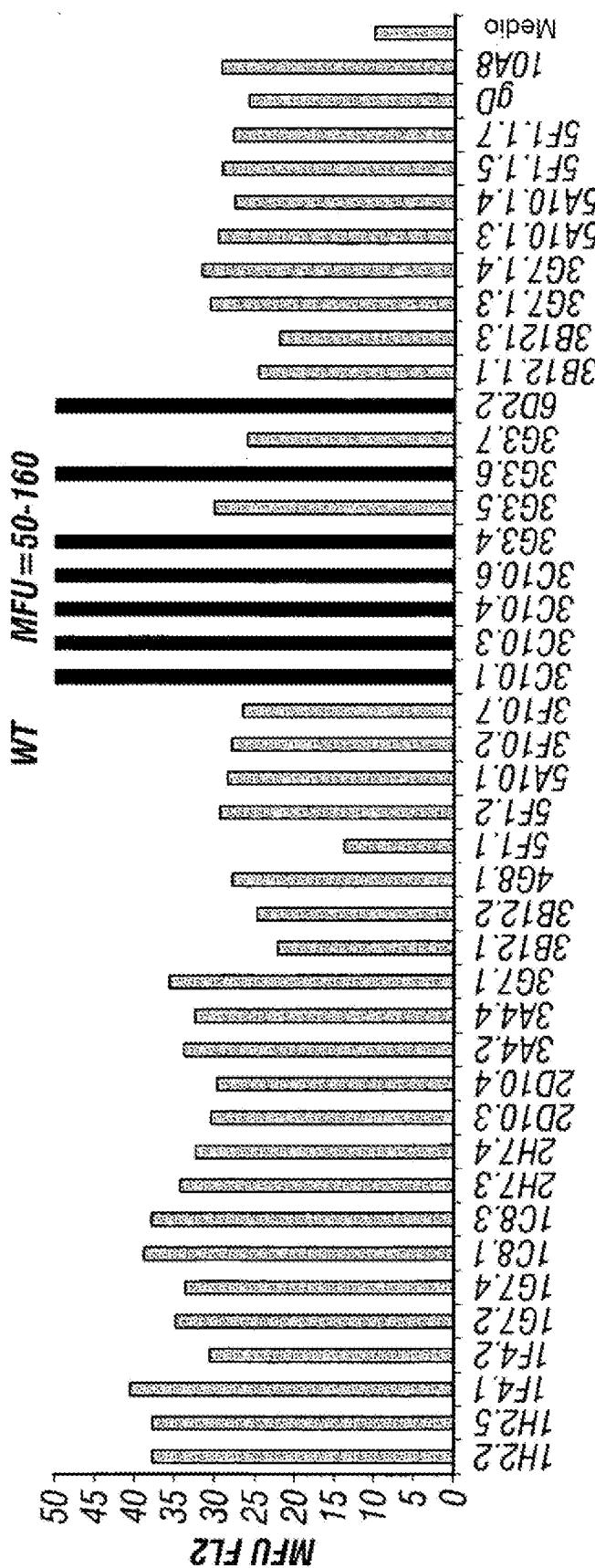


FIG. 4B

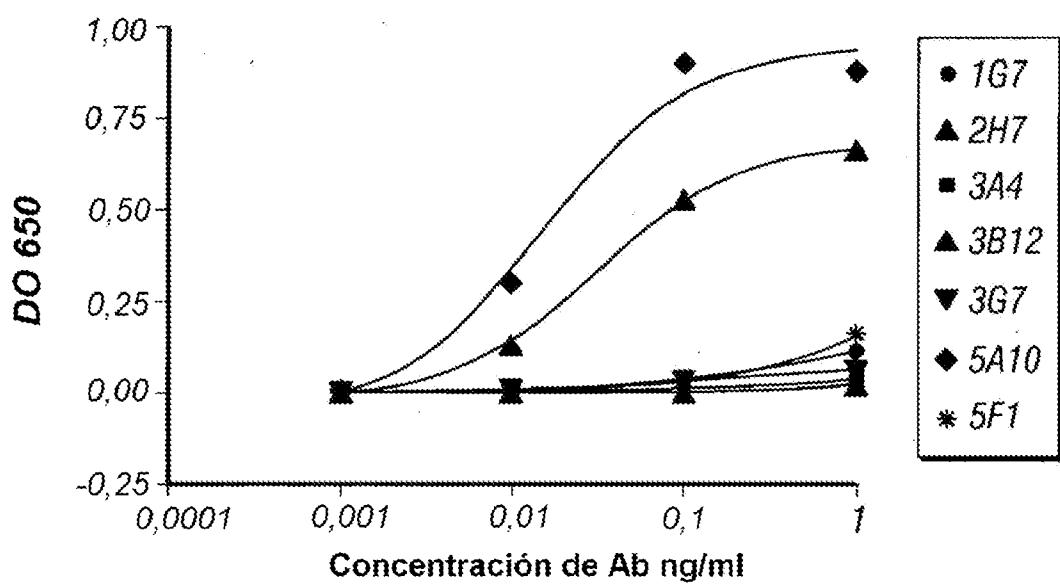


FIG. 5A

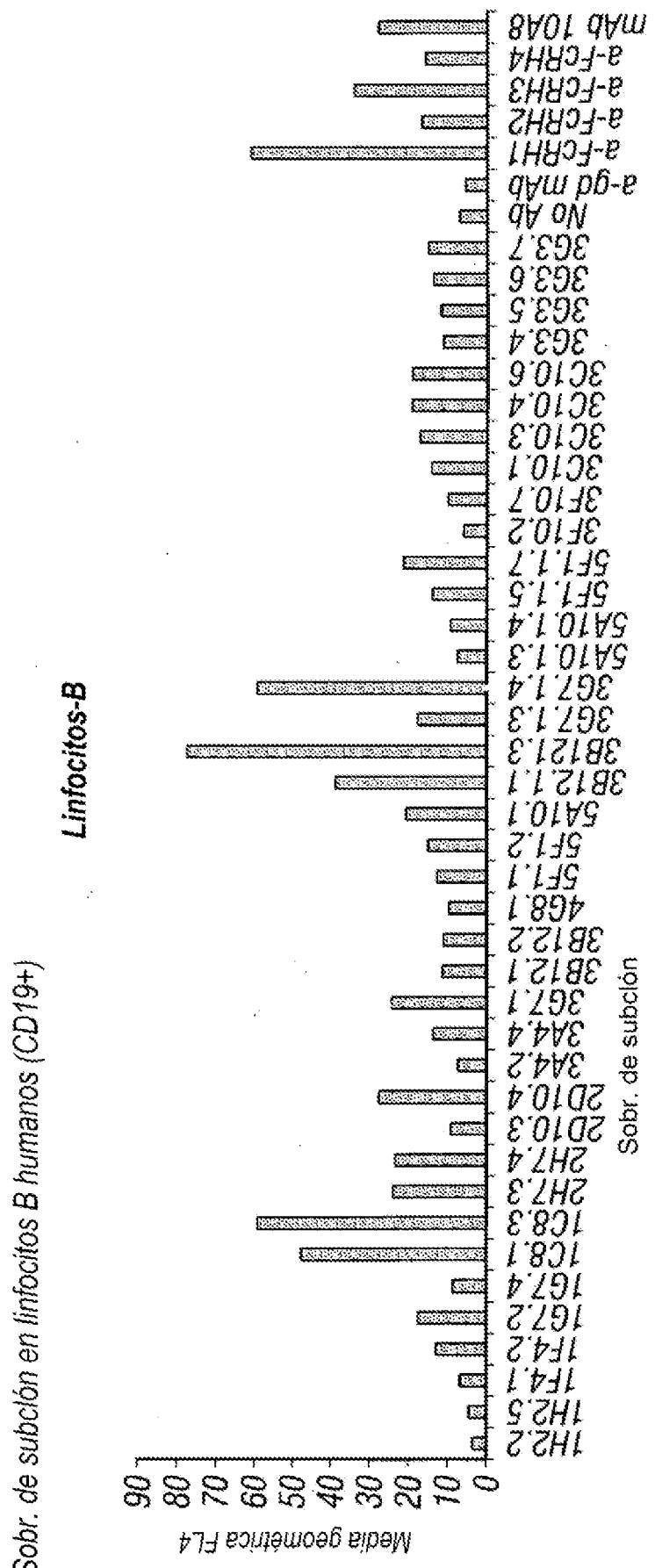


FIG. 5B

FCRH1

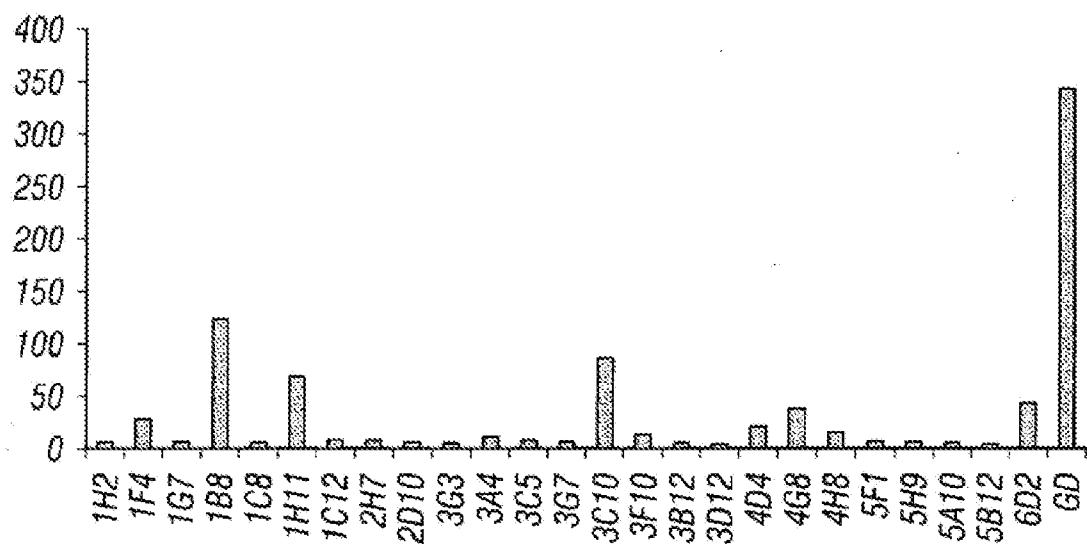


FIG. 6A

FCRH2

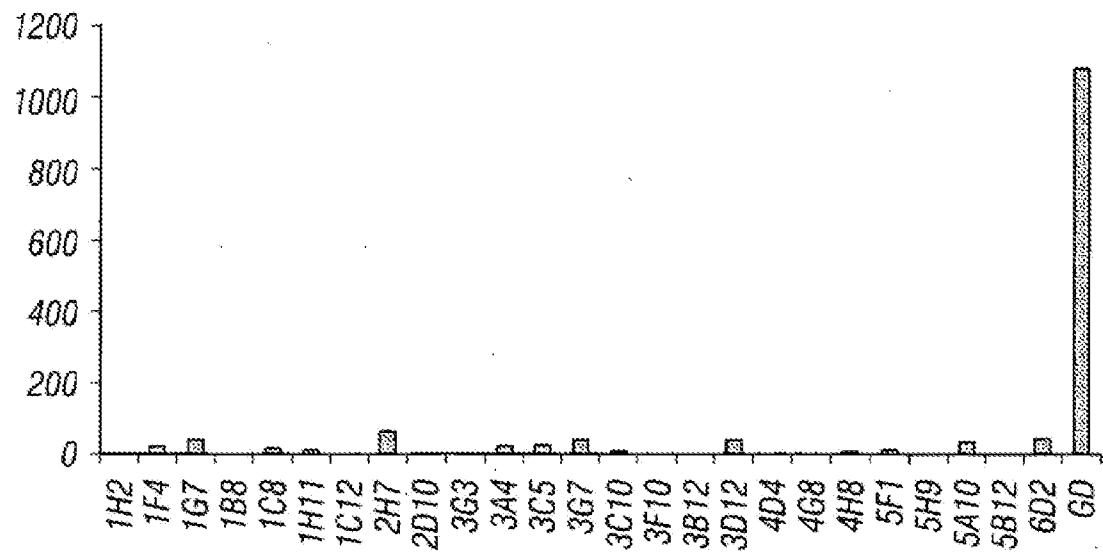
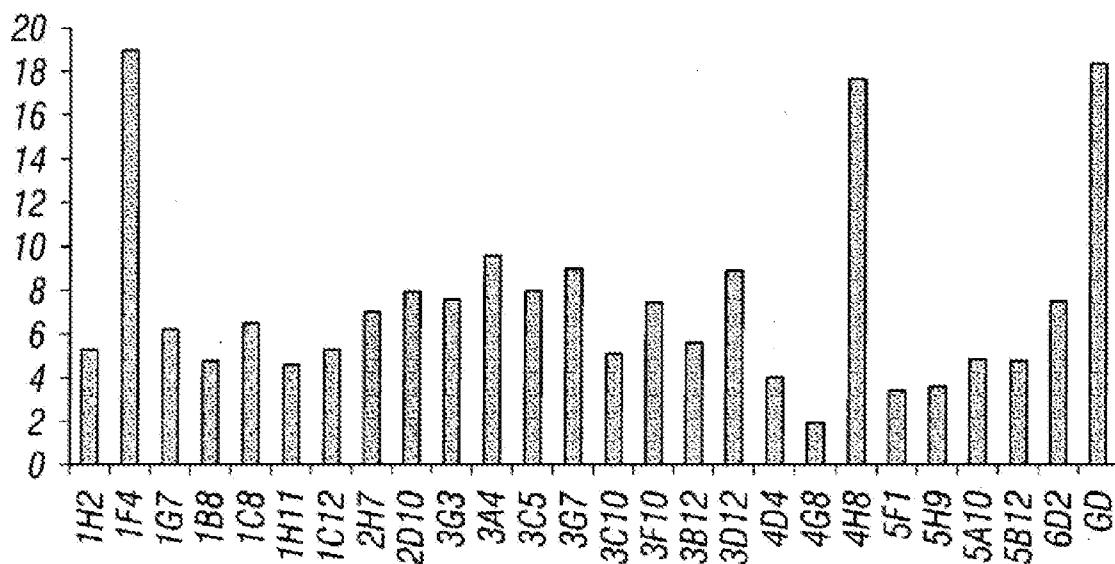
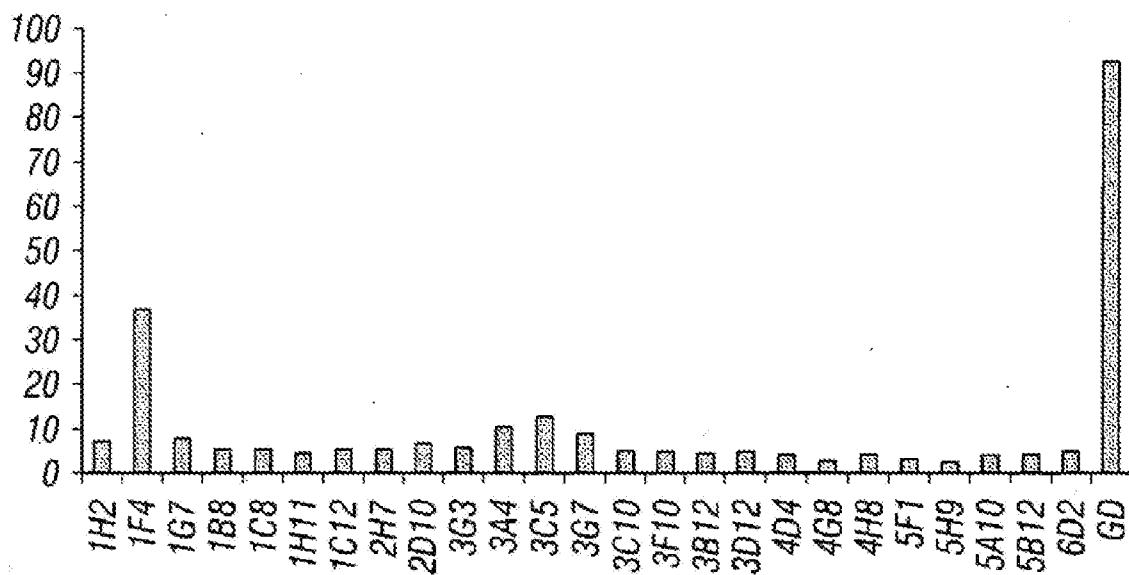


FIG. 6B

FCRH3*FIG. 6C**FCRH4**FIG. 6D*

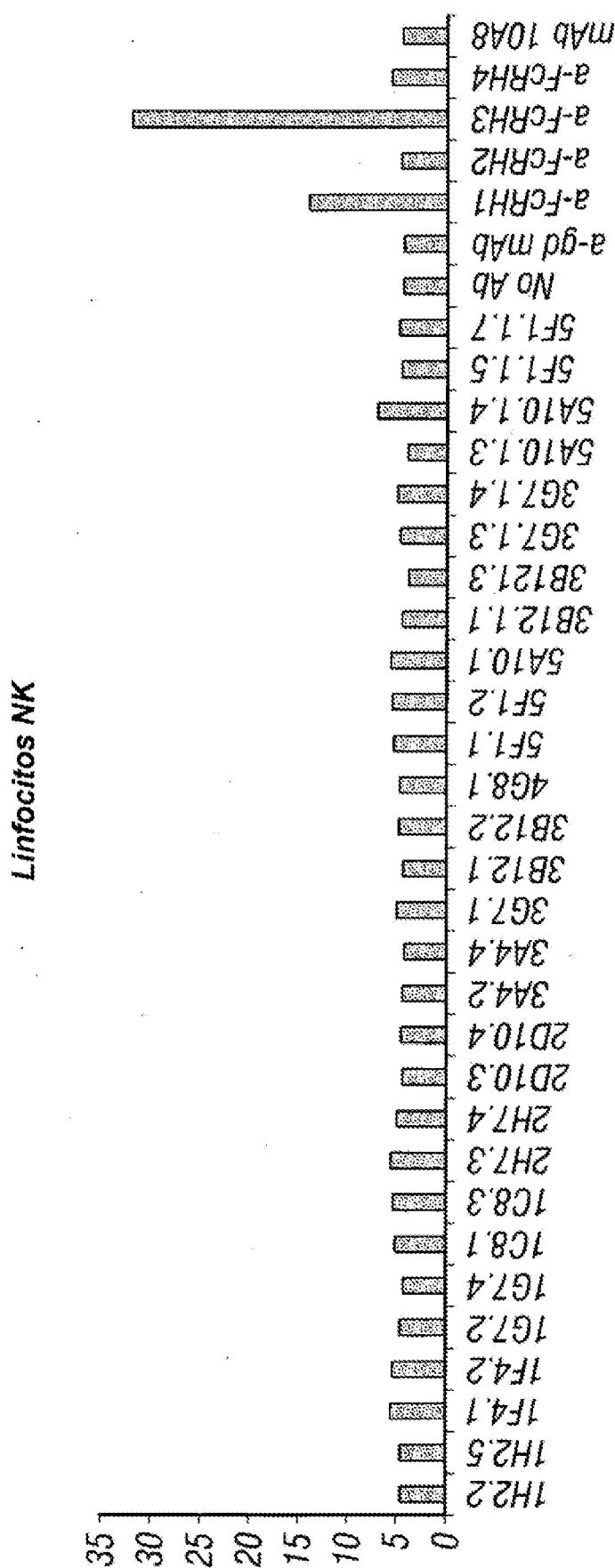


FIG. 7

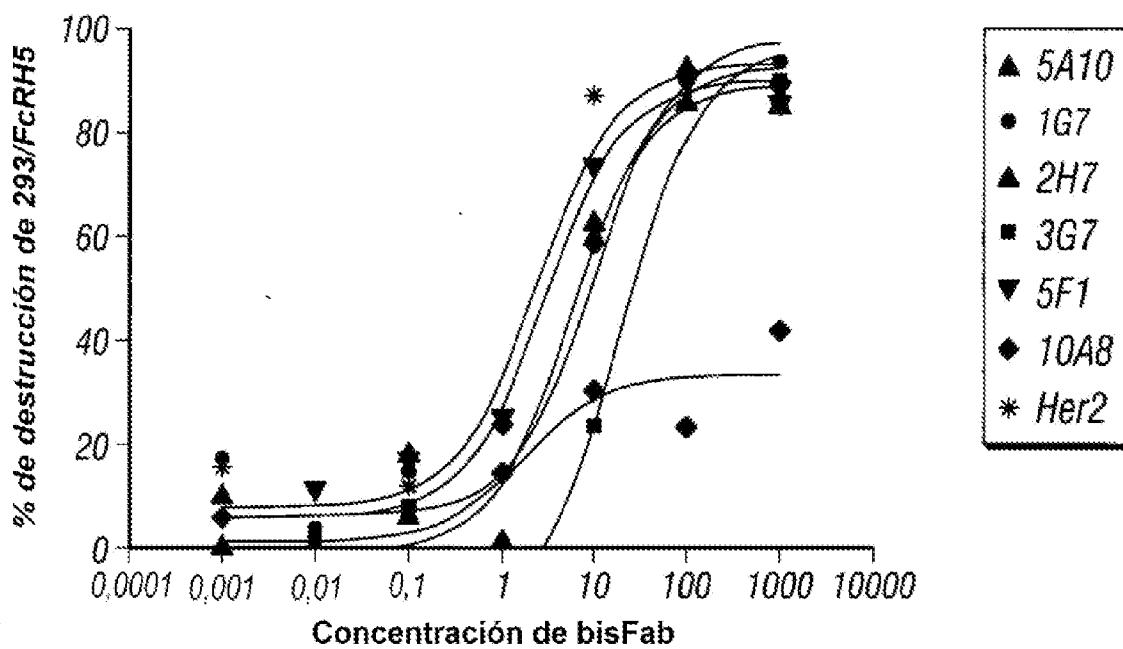


FIG. 8A

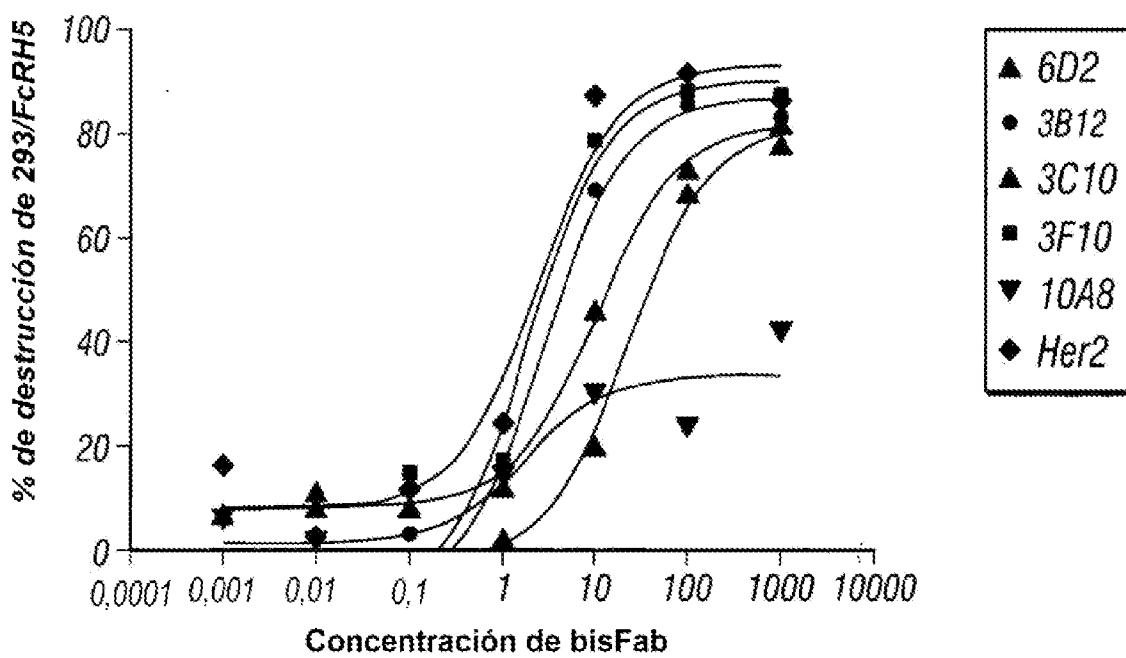


FIG. 8B

